

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



TESIS DOCTORAL

**Estudio de genes de susceptibilidad no- *HLA*
implicados en artritis reumatoide en población
española**

TESIS DOCTORAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M^a Nieves Perdigones Borderías

Directores:

Alfonso Martínez Doncel
Elena Urcelay

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-8780-1

© **M^a Nieves Perdigones Borderías, 2010**

Estudio de genes de susceptibilidad no-*HLA* implicados en Artritis Reumatoide en población española



Presentada por M^a Nieves Perdignes Borderías



Departamento de Microbiología I - Facultad de Medicina - UCM

Estudio de genes de susceptibilidad no-*HLA* implicados en Artritis Reumatoide en población española

**Memoria presentada por la Licenciada M^a Nieves Perdigones Borderías
para optar al grado de Doctor con mención Europea
por la Universidad Complutense de Madrid**

Directores: Dr. Alfonso Martínez Doncel y Dra. Elena Urcelay



**Departamento de Microbiología I
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
2010**

Muchas gracias...

... a todas las personas que componen el Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos: ha sido un orgullo y un placer compartir estos años con vosotros.

... al personal del Servicio de Reumatología del Hospital Clínico San Carlos y del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario La Paz: habeis hecho del trabajo en equipo algo increíblemente sencillo.

... al Ministerio de Educación y Ciencia: que me ha brindado siempre su ayuda.

... a mi familia y amigos: no parece justo comenzar los agradecimientos por ningún orden específico, ya que todos habeis jugado un papel muy importante en este trabajo. Espero que mi memoria no me juegue ninguna mala pasada y que, a lo largo de este breve paseo por mis recuerdos, quede reflejado mi cariño y agradecimiento hacia cada uno de vosotros. “Todo empezó con un empujoncito. El más constante el de mis padres y mis hermanas, el más incondicional el de Mili y Chiva, y el más decisivo el de Marisa y Jose Luis. Así os conocí al resto de vosotros. Vuestras personalidades se encontraban al principio enmascaradas por un título universitario y una gran profesionalidad. El Dr. Gómez de la Concha me acogió en el laboratorio de Inmunología y los Drs. Martínez y Urcelay comenzaron su labor de tutela. El Dr. Fernández-Arquero no dudaba en explicar con todo lujo de detalles los más íntimos secretos de las tecnologías de biología molecular que debería usar los siguientes años, y la Dra. Nuñez se mostraba siempre dispuesta a ayudarme, a pesar de que se la veía constantemente atareada. La primera semana me convertí en la sombra de Jezabel y pronto tuve autonomía suficiente para comenzar mis investigaciones. Las calurosas tardes de verano hicieron de la “teoría del geosinclinal” una fiesta con todo su “poder perruno”, y poco a poco fui conociendo al resto de residentes y becarias. La “patrulla” ha ido cambiando cada año, pues las residencias se acaban y las tesis, aunque no lo parezca, también finalizan. He tenido el placer de compartir con esta “cuadrilla”, más o menos tiempo, desde las falacias de Ana Más hasta los donuts con Luzma (mmmm...). Siempre quedarán cómo le bailan las calles (y las frases) a Winnie la puente (gracias por es hifa como fifa pero con h), darle por la mañana las “buenas noches” a Manmen (ozú mae mia), el tararear de canciones desesperadamente pegadizas de Ana Marquez (a Graná con el granaímmm!), el “pullo” vallecano de Raquelilla (es que viene algo mejor...), las historias surrealistas de María, la sensatez y sabiduría de Laura, el porte “fisioculturista” de Flaquito, las discusiones de la Lamita con sus ancestros, la caballerosidad de Arturo, los juegos malabares de Gorka, y las mil y una preguntas que le formulo a Ana G y que nunca le doy

tiempo a que me responda. Han sido inestimables la sonrisa de *Marisa* cada mañana desde su “cuartito”, la ayuda de *Jose Luis* para poner placas a las 8 de la mañana, la paciencia de *Toñi* para compartir termocicladores y demás aparatos de tortura, la alegría de *Menchu* y *Carmen Poyo*, el humor de *Amparo*, la sinceridad inigualable de *Carmen Martínez* y el vaso siempre casi lleno de *Ángel*. Con los años, la Dra. Nuñez se ha convertido en *Conchi*, un modelo a seguir tanto como persona como investigadora, y los Drs. Martínez y Urcelay en *Alfonso* y *Elena*. Al primero debo agradecerle que haya compartido su impresionante capacidad investigadora de forma paciente y didáctica conmigo y a *Elena* su dedicación constante y su gran capacidad resolutive. Por supuesto no me olvido de vosotras *Ani*, *Peke* y *Mayte* que habéis compartido conmigo la ilusión de realizar este trabajo de investigación. Por todas aquellas pequeñas y grandes cosas que me habéis aportado cada uno de vosotros estos años, de todo corazón, muchas gracias.”

1. ABREVIATURAS	3
2. SUMMARY/RESUMEN	11
3. INTRODUCCIÓN	21
3.1. ASPECTOS GENERALES DELA ARTRITIS REUMATOIDE	23
3.1.1. DEFINICIÓN	23
3.1.2. INCIDENCIA, PREVALENCIA Y CO-MORBILIDAD	23
3.1.3. DIAGNÓSTICO	24
3.1.4. TRATAMIENTO	25
3.2. ETIOPTOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE	26
3.2.1. CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE IMPLICADAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE	28
3.2.2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL DAÑO ARTICULAR	29
3.2.3. CÉLULAS ARTICULARES IMPLICADAS EN LA DESTRUCCIÓN DE LA REGIÓN	30
3.3. FACTORES ETIOLÓGICOS DE LA ARTRITIS REUMATOIDE	32
3.3.1. ESTUDIO DE GENES <i>HLA</i>	32
3.3.2. ESTUDIO DE GENES NO- <i>HLA</i>	34
3.3.2.1. ESTUDIOS DE GENES CANDIDATOS	35
3.3.2.2. ESTUDIOS DE BARRIDO GENÓMICO	36
3.3.2.3. ESTUDIOS DE INTERACCIONES GENÉTICAS	39
4. OBJETIVOS	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	47
5.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS	49
5.2. EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN Y DILUCIÓN DE DNA	49
5.3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN PACIENTES DE ARTRITIS REUMATOIDE	50
5.3.1. DETECCIÓN DEL FACTOR REUMATOIDE	50
5.3.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CCP	50
5.4. ELECCIÓN DE LOS MARCADORES ESTUDIADOS	50
5.5. GENOTIPADO	55
5.5.1. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO	55
5.5.2. MICROSATÉLITES	56
5.5.3. EPÍTOPO COMPARTIDO	57
5.6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	57
5.6.1. COMPROBACIÓN DE LA CALIDAD DEL GENOTIPADO	57
5.6.2. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN	58
5.6.3. COMBINACIÓN DE MUESTRAS DE DISTINTAS POBLACIONES	59
5.6.4. ANÁLISIS DE INTERACCIONES	59
5.6.5. ESTRATIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN	59
5.6.6. POTENCIA DEL ESTUDIO	60
5.6.7. CORRECCIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS	60

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
6.1. ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS	64
6.1.1. REGIÓN 5p13.2: <i>CAPSL/IL7R</i>	65
6.1.2. REGIÓN 20q13: <i>CD40</i>	67
6.1.3. REGIÓN 5p13.4: <i>PTGER4</i>	69
6.1.4. REGIÓN 16p13: <i>CIITA/CLEC16A/SOCS1</i>	71
6.2. REPLICACIÓN DE ESTUDIOS GWAS	77
6.2.1. REGIÓN 9q33: <i>TRAF1/C5</i>	78
6.2.2. REGIÓN 6q23: <i>OLIG3/TNFAIP3</i>	81
6.3. ESTUDIOS DE INTERACCIONES	86
6.3.1. INTERACCIÓN CANDIDATA: <i>TNFRSF14-TNFRSF6B</i>	87
6.3.2. INTERACCIÓN CANDIDATA: <i>FOXP3-CD40, CTLA4, IL2</i>	92
6.3.3. REPLICACIÓN DE LA INTERACCIÓN: <i>IL1-SELS</i>	96
6.3.4. REPLICACIÓN DE LA INTERACCIÓN RTN4- <i>GLIS3</i>	97
6.3.5. ANÁLISIS DE INTERACCIONES LIBRES DE HIPÓTESIS	98
6.4. CONSIDERACIONES FINALES	101
7. CONCLUSIONS/CONCLUSIONES	105
8. REFERENCIAS	111
9. PUBLICACIONES	127
9.1. CHROMOSOMAL REGION 16P13: FURTHER EVIDENCE OF INCREASED PREDISPOSITION ...	129
9.2. 6Q23 POLYMORPHISMS IN RHEUMATOID ARTHRITIS SPANISH PATIENTS	129
9.3. EVIDENCE OF EPISTASIS BETWEEN TNFRSF14 AND TNFRSF6B POLYMORPHISMS IN PATIENTS...	129

1

ABREVIATURAS



ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADAMTS	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
AFF3	<i>AF4/FMR2 family, member 3</i>
AIJ	Artritis idiopática juvenil
Anti-CCP	<i>Anti-cyclic citrullinated peptide</i> (anti-péptido cíclico citrulinado)
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (célula presentadora de antígeno)
AR	Artritis reumatoide
BCR	<i>B-cell receptor</i> (receptor de células B)
BLIMP1	<i>B-lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BRASS	<i>Brigham Rheumatoid Arthritis Sequential Study</i>
C5	<i>Complement component 5</i>
CAPSL	<i>Calcyphosine like</i>
CCL21	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 21</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK6	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>
CIA	<i>Collagen induced arthritis</i> (artritis inducida por colágeno)
CIITA	<i>Class II, major histocompatibility complex, transactivator</i>
CLEC16A	<i>C-type lectin domain family 16, member A</i>
CNV	<i>Copy number variation</i> (variación del número de copias)
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CU	Colitis ulcerosa
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAB2	<i>Disabled homolog 2</i>
DcR3	<i>Decoy receptor 3</i>
DMARDS	<i>Disease modifying anti-rheumatic drugs</i> (fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DT1	Diabetes Tipo 1
EC	Epítipo compartido
ECe	Enfermedad celíaca
ECr	Enfermedad de Crohn

Abreviaturas

EG	Enfermedad de Graves
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EIRA	<i>Swedish Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis</i>
EM	Esclerosis múltiple
<i>ESR1</i>	<i>Estrogen receptor 1</i>
<i>ESR2</i>	<i>Estrogen receptor 2</i>
ETA	Enfermedad tiroidea auto-inmune
EuroAims	<i>European ancestry informative markers</i>
EP	<i>Prostaglandin E receptor</i>
<i>FAP</i>	<i>Fibroblast activation protein, alpha</i>
Fc	Fragmento cristalizable
<i>FCGR2A</i>	<i>Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor</i>
<i>FOXP3</i>	<i>Forkhead box P3</i>
FR	Factor reumatoide
<i>GDF5</i>	<i>Growth differentiation factor 5</i>
<i>GLIS3</i>	<i>GLIS family zinc finger 3</i>
GW	Granulomatosis de Wegener
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> (estudios de barrido genómico completo)
HCSC	Hospital Clínico San Carlos
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HULP	Hospital Universitario La Paz
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i> (equilibrio de Hardy-Weinberg)
IC	Intervalo de confianza
<i>IFIH1</i>	<i>Interferon induced with helicase C domain 1</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig-	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
<i>IL23R</i>	<i>Interleukin 23 receptor</i>
<i>IL2RB</i>	<i>Interleukin 2 receptor, beta</i>
<i>IL7R</i>	<i>Interleukin 7 receptor</i>
<i>KCNH7</i>	<i>Potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 7</i>

KIF5A	<i>Kinesin family member 5A</i>
LB	Linfocito B
LD	<i>Linkage disequilibrium</i> (desequilibrio de ligamiento)
LES	Lupus eritematoso sistémico
LIGHT	<i>Homologous to lymphotoxins exhibiting inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes</i>
LT	Linfocito T
MA	<i>Minor allele</i> (alelo minoritario)
MAF	<i>Minor allele frequency</i> (frecuencia del alelo minoritario)
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MG	<i>Miastenia gravis</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (complejo principal de histocompatibilidad)
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MMEL1	<i>Membrane metallo-endopeptidase-like 1</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> (metaloproteinasa de matriz)
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensajero)
NARAC	<i>North American Rheumatoid Arthritis Consortium</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NOS2A	<i>Nitric oxide synthase 2A</i>
OA	Osteoarthritis
OLIG3	<i>Oligodendrocyte transcription factor 3</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PADI4	<i>Peptidyl arginine deiminase, type 4</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PG	Prostaglandina
PIP4K2C	<i>Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, gamma</i>
PON1	<i>Paraoxonase 1</i>
PRDM1	<i>PR domain containing 1, with ZNF domain</i>
PRKCQ	<i>Protein kinase C, theta</i>
Ps	Psoriasis

PsA	<i>Psoriatic arthritis (artritis psoriásica)</i>
PTGER4	<i>Prostaglandin E receptor 4</i>
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
PTPRC	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
RAG1	<i>Recombination activating gene 1</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
REL	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>
RFX3	<i>Regulator factor X, 3</i>
RTN4	<i>Reticulon 4</i>
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real)</i>
SELS	<i>Selenoprotein S</i>
SLC22A4	<i>Solute carrier family 22, member 4</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido)</i>
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
SPTBN1	<i>Spectrin, beta, non-erythrocytic 1</i>
STAT4	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
TAGAP	<i>T-cell activation RhoGTPase activating protein</i>
TCR	<i>T-cell receptor (receptor de las células T)</i>
TENR	<i>Tenascin-R</i>
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
Th	<i>T helper cell (célula T cooperadora)</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
TNFRSF14	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14</i>
TNFRSF6B	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b</i>
TNFR	<i>TNF receptor</i>
TRAF1	<i>TNF receptor-associated factor 1</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
Treg	<i>Regulatory T-cell (célula T reguladora)</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
VG	<i>Vitíligo generalizado</i>

WTCCC	<i>Wellcome Trust Case Control Consortium</i>
ZGPAT	<i>Zinc finger, CCCH-type with G patch domain</i>

2

SUMMARY

RESUMEN



Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease affecting approximately 1% of European and Western populations. Although its aetiology remains elusive, it is known that genetic and environmental factors trigger disease development and severity. Both factors are being differentially associated with RA subphenotypes. Therefore, the hypothesis has been raised that differential pathways explain RA disease in different subgroups of RA patients which are mainly classified by the presence/absence of anti-cyclic citrullinated peptides (anti-CCP) autoantibodies. Heritability of RA is estimated in approximately 60%, being the major contributor located on the *HLA-DRB1* gene (40% of total heritability). Further studies have revealed the existence of other non-*HLA* genetic risk factors associated with RA. However, over 50% of RA heritability remains to be explained. Herein we have attempted to contribute to expand the genetic knowledge of RA by performing association studies in RA patients and different subphenotypes by analysing single nucleotide polymorphisms (SNPs) and microsatellites. Marker choice was performed on the basis of, first a candidate gene approach and secondly, the findings of Genome Wide Association Studies (GWAS). Finally, we have analyzed genetic interactions by hypothesis-driven and hypothesis-free studies.

The candidate gene approach has been widely used, leading to the description of well known RA susceptibility *loci*, such as *PTPN22*, *STAT4*, *PADI4* and *CTLA4*. Marker choice is based on previous knowledge of the biochemical basis of the disease provided by: animal models, purified protein levels, mRNA differential expression, previous linkage analyses and/or their association to other autoimmune diseases. Accordingly, we consider that the genes *CAPSL/IL7R*, *CD40*, *PTGER4* and *CIITA/CLEC16A/SOCS1*, are well worthy of study on RA susceptibility. In contrast to candidate gene studies, and now dominating the genetic research area, GWAS are hypothesis-free analyses genotyping over 500,000 SNPs along the genome. These hypothesis-free studies have described the association of numerous markers located on the following genetic regions: *TRAF1/C5*, *OLIG3/TNFAIP3*, *CD40*, *TNFRSF14*, *PRKCQ*, *CCL21*, *CDK6*, *KIF5A/PIP4K2C*, *IL2RB*, *CD28*, *IL2/IL21*, *CD2/CD58*, *PRDM1/BLIMP1*, *PTPRC*, *TRAF6/RAG1*, *FCGR2A* and *REL*. However, an isolated description of association is not enough to warrant its reliability. Replication is consequently very important for the validation of genetic susceptibility factors. Otherwise, some factors like type I errors may increase the probability of false positive results. Our work attempts to replicate the associations of SNPs located on the *TRAF1/C5* and the *OLIG3/TNFAIP3* regions in the Spanish population. Even after GWAS important breakthroughs, more than a half of the RA heritability remains to be explained and consequently, other genetic factors must be involved. Our work aims to unravel this issue by studying hypothesis-driven and hypothesis-free gene-gene interactions. An hypothesis-driven epistasis analyzed in the present work includes two polymorphisms related to genes encoding members of TNF receptor superfamily (*TNFRSF14* and *TNFRSF6B*). In support of this interaction, the implication of these genes in the inflammatory process

which is the hallmark of autoimmune diseases, and their binding by a shared ligand (LIGHT) which has been observed to be over-expressed in the synovium of RA patients. Another hypothesis-driven interaction analyzed in this work aims to explain, from a genetic standpoint, the misfunction that affects regulatory T-cells (Treg) on RA disease. In this sense, we propose an epistasis between *FOXP3* and SNPs located on regions including the *CD40*, *CTLA4* and *IL2* genes. Up to date, studies describing epistasis on RA disease have proposed the interaction between polymorphisms related to the *IL1-SELS* and *RTN4-GLIS3* genes, but no replication has been published yet. Thus, we have tried to replicate these results on well-powered collections of Spanish RA patients. Finally, as the description of interactions in RA disease is scarce and they may contribute to RA heritability, we aimed to perform an hypothesis-free-interaction study. For this purpose, we analyzed 43 SNPs involved in inflammatory processes which had been independently assessed in previous RA association studies.

Our studies have been performed with RA patients diagnosed according to the American College of Rheumatology criteria and healthy blood donors without family history of any autoimmune disease. Patients and controls were white Spaniards recruited at Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Madrid, Spain. For replication purposes we have analysed an independent collection of RA patients recruited at Hospital Universitario La Paz (HULP), Madrid, Spain. DNA was extracted by standard methods. SNP genotyping has been performed by using Taqman chemistry, while microsatellite genotyping was performed by PCR followed by capilar electrophoresis. Statistical analysis was executed with a standard software (EpilInfo v.6.02) and homogeneity and Cochran-Mantel-Haenszel tests were performed with EpiDat 3.1. Every analysis of interaction but the hypothesis-free one, was made by direct count. For the hypothesis-free epistasis study we analysed linkage disequilibrium (LD) using the Haploview 4.0 program as a screening tool. Potential population stratification was addressed by genotyping five European Ancestry Informative Markers (EuroAIMs) (rs12440216, rs12905017, rs2060983, rs1404402, rs1542678). No significant differences in allele frequencies between patients and controls were observed for these EuroAIMs ($p_c > 0,05$, ORs between 1,03-1,19).

Our results of the candidate *CAPSL/IL7R*, *CD40* and *PTGER4* genes studies do not evidence any significant association with any subphenotype of the RA disease, in the Spanish population. In contrast, our candidate study of the *CIITA/CLEC16A/SOCS1* region shows new evidence of association with RA, unraveling its key importance in the Spanish population. The present work also stresses the critical importance of performing genetic replication analyses, as it is already known that differences in LD and gene-gene or gene-environment interactions could differ between populations. In this sense, we demonstrate that the

rs6920220 located in 6q23 is a good marker of association with seropositive RA disease in the Spanish population. In addition, we suggest that both, rs10499194 (in 6q23) and rs3761847 (in *TRAF1/C5*) are associated with RA disease, but their effects differ between North-American and European populations. Finally, this work also highlights the importance of gene-gene interactions in RA susceptibility and assesses for the first time the epistasis between two polymorphisms (rs6684865 and rs4809330) close to genes encoding members of the TNF receptor superfamily (*TNFRSF14* and *TNFRSF6B*), in RA Spanish patients. Our results prove that the effect of the susceptibility risk allele of the *TNFRSF14* affects only to a subgroup of RA patients who carry the risk genotype for *TNFRSF6B*. Evidence of association of *FOXP3* with *CD40*, *CTLA4* and *IL2* was initially observed with RA Spanish patients. However, these interactions are unlikely to be real, because no replication could be achieved. Our results do not replicate the previously described interactions between *IL1-SELS* and *RTN4-GLIS3*, suggesting that they are false positive associations. Finally, no reproducible interaction was observed in the hypothesis-free analysis of 43 markers involved in inflammatory processes.

In summary, our work contributes to unveil the genetic basis of RA in the Spanish population by assessing novel genetic risk factors and validating others. In addition, we show based on the evidence of our research that some genetic factors contribute specifically to RA development in certain RA subgroups of patients, supporting the idea that a comprehensive RA classification should be sought.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad auto-inmune inflamatoria crónica que afecta aproximadamente al 1% de la población europea y norteamericana. Aunque la causa última de la enfermedad todavía no ha sido determinada, se sabe que existen factores genéticos y ambientales implicados en el desarrollo y la severidad de la enfermedad. Ambos factores se están asociando diferencialmente con subfenotipos de la enfermedad. Por ello, se postula que existen diferentes vías patogénicas que explican la AR en diferentes subgrupos de pacientes que se clasificarían principalmente por la presencia/ausencia de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP o *anti-cyclic citrullinated peptide antibodies*) en suero. La heredabilidad de la AR se estima en un 60% y el principal factor de susceptibilidad lo constituye la región *HLA-DRB1* (explica el 40% de la heredabilidad total). También se han identificado *loci* de susceptibilidad no-*HLA*, pero la suma de todos los factores genéticos de riesgo conocidos hasta el momento apenas alcanza a explicar el 50% de la susceptibilidad genética a la AR. En este trabajo nos proponemos contribuir al avance del conocimiento de la genética de la AR realizando estudios de asociación caso-control, así como estudios en distintos subgrupos de pacientes de AR mediante el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs o *single nucleotide polymorphisms*) y microsatélites. La elección de los marcadores en estudio se basó primero en análisis de genes candidatos y más tarde en los resultados obtenidos de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS o *Genome Wide Association Studies*). Por último, analizamos interacciones genéticas con o sin hipótesis de partida.

Los análisis de genes candidatos han sido la base del estudio de la AR durante muchos años y han permitido describir y validar *loci* de susceptibilidad a esta enfermedad como *PTPN22*, *STAT4*, *PADI4* y *CTLA4*. En esta estrategia, la elección de los marcadores se basa en el conocimiento previo de la base bioquímica de la enfermedad, en modelos animales, en estudios de variaciones en los niveles de proteína purificada, en la expresión diferencial de mRNA, en los análisis de ligamiento, o en su asociación a otras enfermedades autoinmunes. De acuerdo con esta estrategia, parece interesante analizar en AR las regiones candidatas *CAPSL/IL7R*, *CD40*, *PTGER4* y *CIITA/CLEC16A/SOCS1*. Al contrario de lo que sucede con los estudios de genes candidatos, los GWAS son análisis libres de hipótesis que dominan actualmente el panorama del estudio genético. Los GWAS analizan más de 500.000 SNPs distribuidos a lo largo del genoma y han logrado grandes avances en el conocimiento de la AR gracias a la descripción de las regiones genéticas *TRAF1/C5*, *OLIG3/TNFAIP3*, *CD40*, *TNFRSF14*, *PRKCQ*, *CCL21*, *CDK6*, *KIF5A/PIP4K2C*, *IL2RB*, *CD28*, *IL2/IL21*, *CD2/CD58*, *PRDM1/BLIMP1*, *PTPRC*, *TRAF6/RAG1*, *FCGR2A* y *REL*. Sin embargo, la descripción aislada de la susceptibilidad de un factor genético a la enfermedad no garantiza su veracidad. Por lo tanto, la replicación es un tema de gran relevancia que permite validar la asociación de factores genéticos a la enfermedad. La falta de estudios de replicación podría incrementar la probabilidad de describir falsas

asociaciones debido a distintos factores como errores de tipo I. Nuestro trabajo por lo tanto pretende replicar en población española la asociación de los SNPs localizados en las regiones *TRAF1/C5* y *OLIG3/TNFAIP3*. A pesar de los inigualables avances logrados por los GWAS, falta por explicar más del 50% de la heredabilidad a la AR, por lo que otros factores genéticos deben estar implicados. Nuestro trabajo también incide en este último punto y analiza interacciones genéticas con y sin hipótesis previa. Una de las interacciones que proponemos implicaría a dos SNPs localizados en regiones que codifican miembros de la superfamilia de receptores del TNF (*TNFRSF14* y *TNFRSF6B*). Estos genes están implicados en los procesos inflamatorios y los péptidos codificados por ellos tienen un ligando común (LIGHT) que se encuentra sobreexpresado en el sinovio de pacientes con AR. La segunda interacción que proponemos intenta explicar desde un punto de vista genético las alteraciones en la funcionalidad de las células T reguladoras (Treg), que se observan en los enfermos de AR. Así analizamos la epistasis entre *FOXP3* (que codifica el principal factor de transcripción específico de las células Treg) y SNPs localizados en las regiones que incluyen a los genes *CD40*, *CTLA4* e *IL2*. Hasta el momento sólo se ha publicado un estudio de interacción en AR entre genes candidatos (*IL1-SELS*) y un análisis de epistasis sin hipótesis previa en el que se observa la asociación entre *RTN4* y *GLIS3*. Sin embargo, su replicación todavía no ha sido publicada. Por lo tanto, nosotros tratamos de replicar estos resultados en nuestra población. Finalmente, llevamos a cabo un estudio de interacciones sin hipótesis previa con 43 SNPs implicados en procesos inflamatorios que habían sido analizados de forma independiente en otros estudios de nuestro grupo de investigación y que pertenecían a 17 regiones cromosómicas distintas.

Nuestros estudios se han llevado a cabo en pacientes de AR diagnosticados según los criterios del ACR (*American College of Rheumatology*) y controles sanos. Tanto los pacientes como los controles eran individuos caucásicos españoles que acudían al Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Madrid, España. También se ha analizado con fines de replicación un grupo independiente de pacientes de AR caucásicos españoles que acudían regularmente al Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Paz (HULP), Madrid, España. El DNA se extrajo mediante una técnica estándar a partir de sangre periférica. El genotipado de las muestras fue realizado mediante análisis de SNPs con tecnología Taqman y de microsatélites mediante PCR seguida de electroforesis en capilar. El análisis estadístico se realizó con el *software* EpiInfo v.6.02 y las pruebas de homogeneidad y de Cochran-Mantel-Haenszel con EpiDat 3.1. Todos los análisis de interacción, salvo los que no partían de hipótesis previa, se realizaron con contaje directo de la base de datos. Para los análisis de interacción sin hipótesis previa, primero se analizó el desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs con el programa Haploview 4.0. La posible estratificación de la población fue controlada mediante el genotipado de cinco marcadores informativos ancestrales de la población europea (EuroAIMs o *European*

ancestry informative markers) (rs12440216, rs12905017, rs2060983, rs1404402, rs1542678). No se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre enfermos de AR y controles para ninguno de estos polimorfismos ($p_c > 0,05$, ORs entre 1,03-1,19).

Nuestros análisis de las regiones candidatas *CAPSL/IL7R*, *CD40* y *PTGER4* no muestran evidencias de una asociación específica con ningún subfenotipo de AR en población española. En cambio, el estudio de la región candidata *CIITA/CLEC16A/SOCS1* muestra nuevas evidencias de asociación de esta región a la AR en población española. Recalcamos la gran importancia de los análisis de replicación, ya que pueden existir diferencias en el LD o las interacciones genéticas o genético-ambientales entre poblaciones. En este sentido, demostramos que el SNP rs6920220 localizado en la región 6q23 es un buen marcador de AR seropositiva en población española. Además sugerimos que los SNPs rs10499194 (en 6q23) y rs3761847 (en *TRAF1/C5*) se asocian a AR, pero que su efecto difiere entre poblaciones norteamericanas y europeas. Por último este trabajo subraya la importancia de las interacciones genéticas en la susceptibilidad a AR, y describe y replica por vez primera la interacción entre dos polimorfismos (rs6684865 y rs4809330) situados en las regiones que codifican miembros de la superfamilia de receptores del TNF (*TNFRSF14* y *TNFRSF6B*, respectivamente), en pacientes españoles de AR. Demostramos que el riesgo que confiere el alelo de susceptibilidad del *TNFRSF14* afecta a un grupo concreto de pacientes que son portadores del alelo de susceptibilidad para *TNFRSF6B*. Observamos asociaciones nominalmente significativas entre un haplotipo de *FOXP3* y los marcadores localizados en las regiones de *CD40*, *CTLA4* e *IL2*, aunque nuestros estudios de replicación no validan los resultados. Tampoco replicamos las interacciones entre *IL1-SELS* y *RTN4-GLIS3*, sugiriendo que pueden ser interacciones falsas positivas. Finalmente, no conseguimos validar las interacciones observadas en nuestro estudio de epistasis sin hipótesis previa.

En resumen, nuestro trabajo contribuye al conocimiento de la base genética de la AR en población española, ya que propone la asociación de nuevos factores genéticos de susceptibilidad y valida otros. Además, nuestro trabajo demuestra la existencia de factores genéticos de susceptibilidad que contribuyen específicamente al desarrollo de AR en ciertos subgrupos de pacientes, lo que apoya la idea de que se debería revisar la actual clasificación de la AR.

3

INTRODUCCIÓN



1.1. Aspectos generales de la Artritis Reumatoide

1.1.1. Definición

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica auto-inmune caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones sinoviales. Su definición ha sido objeto de continua evolución desde que el término “AR” fue acuñado por primera vez en 1859¹. De hecho, algunas de las antiguas formas clínicas de la AR son hoy consideradas enfermedades con una entidad propia, como el lupus eritematoso sistémico (LES) o la osteoartritis (OA). Hoy en día, el diagnóstico clínico de la AR se basa en el cumplimiento de cuatro de las siete características fenotípicas establecidas en los criterios del ACR (*American College of Rheumatology*) de 1987². Aún así, las características epidemiológicas, genéticas y clínicas de la AR varían considerablemente entre pacientes, y muchos autores reabren el debate: ¿es la AR una única enfermedad o engloba todavía a un conjunto de enfermedades?

1.1.2. Incidencia, prevalencia y co-morbilidad

Los estudios existentes sobre la incidencia de la AR, estiman que el número de casos nuevos que se detectan anualmente en población caucásica es de 2-5 por cada 10000 individuos³. Durante las últimas cuatro décadas se ha detectado una disminución de los casos diagnosticados de AR⁴, aunque esta tendencia podría estar actualmente invirtiéndose⁵. Por ello, se postula que la incidencia pudiera presentar una tendencia cíclica con posible implicación de agentes patógenos.

La proporción de individuos que padecen AR en población caucásica fluctúa entre un 0,5-1%⁶. La prevalencia de la AR es máxima en poblaciones indígenas de Alaska y América del Norte (6,8-7,1% en la tribu Chippewa⁷), y se estima en valores muy bajos (alrededor de 0,3%) en poblaciones asiáticas^{8,9}. Los estudios realizados en poblaciones africanas, aunque escasos, no han conseguido identificar todavía individuos afectados con AR^{10,11}. Las diferencias en la prevalencia de AR observadas entre distintas poblaciones no dependen tanto de las diferencias metodológicas entre estudios como de la diferencia de factores genéticos y/o ambientales que afectan al desarrollo de la enfermedad en estas poblaciones. Como claro ejemplo de la imbricación de ambos factores, se ha observado que la prevalencia de AR en una población de origen pakistaní con asentamiento en Inglaterra es inferior a la prevalencia de AR en la isla, pero superior a la observada en Pakistán¹². En cuanto a la distribución por sexos, la prevalencia es superior en mujeres que en hombres con un ratio de 3:1. Por ello se cree que pudieran estar implicados factores hormonales en el desarrollo de la enfermedad.

Las complicaciones que se manifiestan más frecuentemente en individuos afectados de AR son las de tipo cardiovascular (isquemia coronaria, fallo cardíaco e infarto de miocardio), hematológico (anemia), hiperplásico (linfoma, cáncer de pulmón y cáncer de piel), respiratorio (enfermedad intersticial pulmonar), infeccioso, gastrointestinal (úlceras gastrointestinales) y psicológico (depresión).

1.1.3. Diagnóstico

Durante años se ha intentado establecer una clasificación de la AR fundamentada en las características serológicas de los pacientes. La mejor aproximación a este objetivo hasta hace poco la ofrecía el factor reumatoide (FR), una inmunoglobulina (Ig) de isotipo IgM normalmente, dirigida frente al fragmento cristalizable (Fc) de las moléculas de IgG. Sin embargo, su presencia en individuos que padecen otras enfermedades autoinmunes (síndrome de Sjögren), infecciosas (hepatitis o tuberculosis) o en individuos de edad avanzada, la convierten en un elemento diagnóstico de escasa especificidad. Los anticuerpos anti-factor perinuclear y anti-queratina son anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP o *anti-cyclic citrullinated peptide*) mucho más específicos que se unen a un mismo antígeno, la filagrina^{13,14}. Esta proteína contiene residuos de citrulina necesarios para el reconocimiento específico por los auto-anticuerpos. La citrulinación es un proceso post-traducciona l en el que un enzima dependiente de calcio, la peptidil arginina deiminasa, deimina un residuo básico de arginina, transformándolo en un aminoácido neutro, la citrulina. Aunque no se conoce la función específica de los péptidos citrulinados, no debemos olvidar su gran interés inmunológico, puesto que una modificación post-traducciona l puede ser importante en la pérdida de la tolerancia inmunológica si esta modificación ocurre en la periferia y no en el timo. Los anticuerpos anti-CCP han sido muy utilizados en investigación y comienzan a serlo en la práctica clínica. Se considera que los anticuerpos anti-CCP deberían ser incluidos en los criterios diagnósticos de la AR, ya que su presencia es detectable años antes del desarrollo de la enfermedad^{15,16} y el título de anticuerpos se mantiene estable. Además, su presencia se ha asociado con formas más severas de la enfermedad, lo que le concede valor pronóstico¹⁷. Por último, se ha observado que existen ciertos factores genéticos y ambientales asociados en exclusiva a la enfermedad anti-CCP positiva o a la negativa^{18,19}. Por ello, muchos autores defienden la idea de que la AR es un conjunto de entidades clínicas divisible al menos en dos grupos distintos caracterizados por la presencia o ausencia de anticuerpos anti-CCP^{20,21}.

Criterios Diagnósticos

El criterio de clasificación clínico actual de la AR fue definido en 1987 por el ACR². Esta clasificación especifica la necesidad de que el paciente manifieste cuatro cualesquiera de los siguientes siete síntomas (los criterios 1 a 4 deben perdurar al menos durante seis semanas).

1. Rigidez matutina: en y alrededor de las articulaciones durante una hora o más.
2. Artritis en 3 ó más áreas articulares: de forma simultánea con ligera tumefacción o fluido tisular (no sólo sobrecrecimiento óseo). Las 14 posibles áreas donde se manifieste la artritis son la articulación interfalángica proximal, articulación metacarpo-falángica, muñeca, codo, rodilla, tobillo o articulaciones metatarso-falángicas de las extremidades derecha o izquierda.
3. Artritis en articulaciones de las manos: con tumefacción como la definida en el criterio anterior en, al menos, una de las siguientes áreas: muñeca, articulación metacarpo-falángica o articulación interfalángica proximal.
4. Artritis simétrica: implicación simultánea de las mismas áreas articulares (como las definidas en el punto 2) de ambos lados del cuerpo (la implicación bilateral de las articulaciones interfalángica-proximal, metacarpo-falángica y metatarso-falángica se aceptan aunque no exista exacta simetría).
5. Nódulos reumatoides: presencia de nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas, superficie de los extensores, o en regiones yuxta-articulares.
6. Factor reumatoide en suero: demostración de cantidades anormales de FR en suero por cualquier método por el que el resultado sea positivo para menos de un 5% de la población control.
7. Cambios radiológicos: cambios radiológicos típicos de la AR en radiografías antero-posteriores de mano y muñecas, que deben incluir erosiones o descalcificaciones óseas inequívocas localizadas en o de forma adyacente a las articulaciones implicadas (cambios aislados de OA no cumplen los requisitos).

1.1.4. Tratamiento

Los reumatólogos subrayan la importancia de comenzar el tratamiento contra la AR de forma temprana, es decir, antes incluso de completar los criterios diagnósticos del ACR²². De este modo se trata de prevenir la destrucción de la articulación, o al menos ralentizarla, manteniendo su funcionalidad. Tras

establecer un diagnóstico temprano y documentar la actividad basal de la enfermedad (a través del DAS o *disease activity score*²³) se inicia el tratamiento, generalmente con DMARDs (*disease modifying anti-rheumatic drugs*). La lista de medicamentos modificadores de la enfermedad, encabezada por el metotrexato, incluye fármacos como la lefunomida, la ciclofosfamida, los esteroides sistémicos, la azatioprina, la sulfasalazina, la hidroxicloroquina y las sales de oro. Si los pacientes no responden a la terapia con DMARDs tras los primeros meses de tratamiento, suele indicarse una terapia biológica, que podría combinarse al uso del metotrexato. Los medicamentos biológicos se clasifican atendiendo al tipo de molécula sobre la que actúan. Así encontraremos medicamentos que actúan sobre el factor de necrosis tumoral (TNF o *tumor necrosis factor* (etanercept, infliximab y adalimumab)), sobre la interleucina 1 (IL-1 (anakinra)), sobre células T (abatacept) y células B (rituximab).

1.2. Etiopatogenia de la Artritis Reumatoide

Las causas determinantes de la AR todavía no han sido establecidas, aunque existen numerosas teorías al respecto. La más defendida argumenta que, en un entorno propenso a la auto-inmunidad, algún evento desencadena el daño articular, la inflamación sinovial y la presentación clínica. En la AR se cree que el proceso de auto-tolerancia, que comienza en el timo o en la médula osea (sistema de tolerancia central) y que continúa en el sistema periférico (sistema de tolerancia periférico) se encuentra afectado. La distinción de proteínas propias frente a exógenas comienza para las células T en el timo. En este compartimento, se produce la selección negativa de las células T inmaduras como consecuencia del reconocimiento de antígenos propios que son presentados por las células del estroma tímico a los timocitos. El reconocimiento de antígenos propios genera una señal negativa en las células T inmaduras que concluye en su muerte o inactivación. Sin embargo, el timo no expresa todas las proteínas propias (aunque sí muchas de compartimentos ajenos a este órgano, gracias a un factor de transcripción conocido como AIRE (*autoimmune regulator*)), y la presencia de células auto-reactivas en el organismo es inevitable. Existen subsiguientes mecanismos de auto-tolerancia periférica con el fin de evitar la activación de estas células auto-reactivas:

- i) en presencia de fuertes y persistentes señales antigénicas, la activación continua de los receptores antigénicos puede favorecer el proceso de tolerancia en los linfocitos;
- ii) no existe activación linfocitaria sin la co-presencia de señales co-estimuladoras que son características de los procesos infecciosos. Sin estas señales la célula T se ve implicada en un proceso de anergia que la hace hipo-respondedora;

iii) las células auto-reactivas pueden ser suprimidas por células T reguladoras (Treg) siempre y cuando los antígenos se encuentren en el mismo tejido o sean presentados por la misma célula presentadora de antígeno (APC o *antigen presenting cell*);

iv) las células auto-reactivas pueden ser reguladas de forma intrínseca al sufrir apoptosis, pues su capacidad de supervivencia y proliferación, como la de cualquier otra célula, es limitada.

En resumen, el entorno de auto-inmunidad al que referencia la etiopatogenia de la AR podría implicar alteraciones en cualquiera de los procesos de regulación anteriormente descritos y depende de factores genéticos y ambientales. Entre los desencadenantes del daño articular se barajan factores biomecánicos, neuroinmunológicos o alteraciones en la función microvascular²⁴. En cualquier caso, durante el desarrollo de la AR se activan células implicadas en la inmunidad innata y adaptativa generando inflamación y en último término destrucción articular (Figura 1).

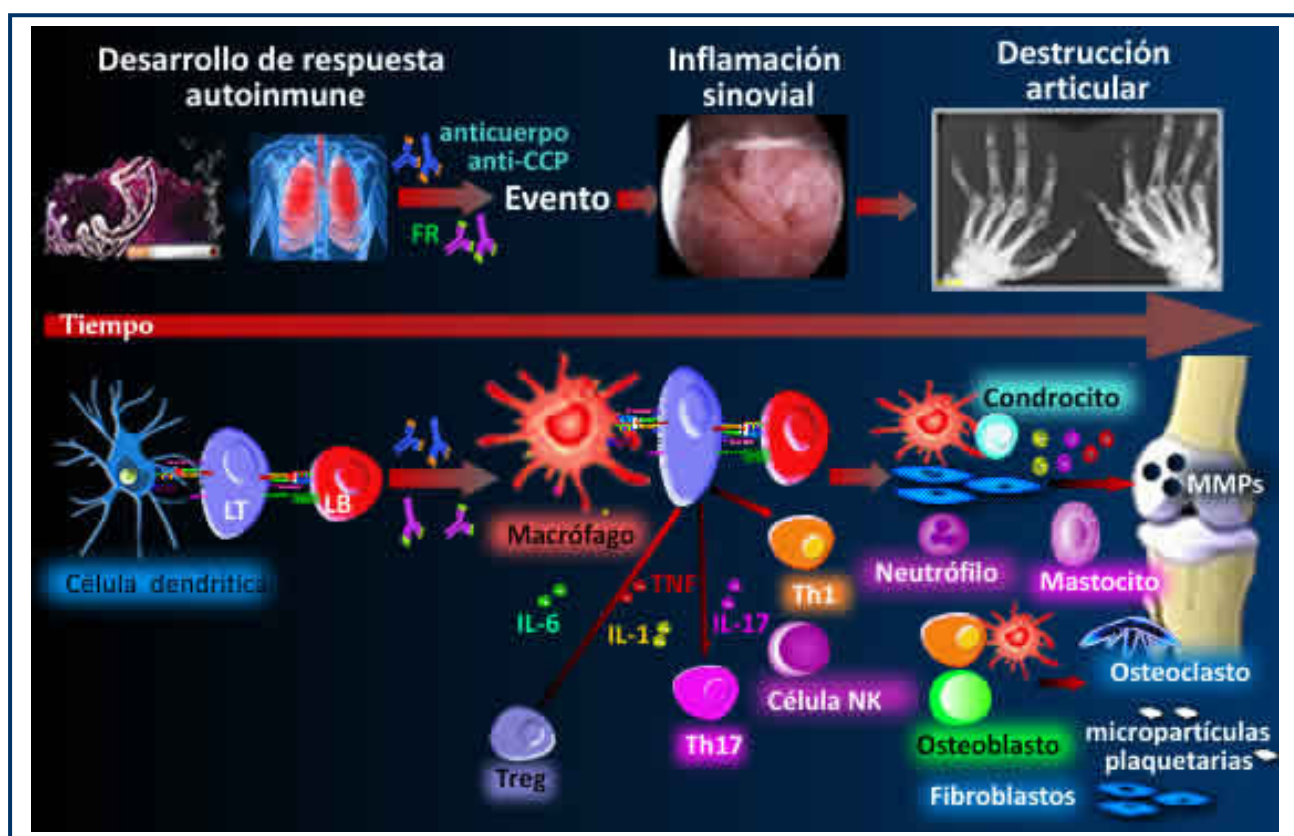


Figura 1: Posible escenario de la etiopatogenia de AR. La respuesta inmune comienza años antes de la enfermedad debido a factores genéticos y/o ambientales. Algún evento, como factores biomecánicos o agentes patógenos conducen al desarrollo de la manifestación clínica con inflamación y posterior destrucción articular. En la parte superior de la figura se muestran los posibles factores implicados en el desarrollo de la enfermedad. En la parte inferior se muestran las células implicadas en cada fase. Figura adaptada de Klareskog *et al.*, 2009²⁵. Anti-CCP= anticuerpo anti péptido cíclico citrulinado; FR= factor reumatoide; MMPs= metaloproteinasas de matriz. LT= linfocito T. LB= linfocito B. Th= célula T cooperadora.

1.2.1. Células de la respuesta inmune implicadas en la artritis reumatoide

Células T: los estudios histológicos, genéticos, farmacológicos y en modelos animales implican a las células T en la patogenia de la AR. De hecho, el análisis de muestras de tejidos sinoviales de pacientes con AR, revela la existencia de distintas subpoblaciones de células T compatibles con los fenotipos de las líneas celulares de las células T cooperadoras (Th o *T-helper*) tipo Th1 y Th17, y Treg^{26,27,28}. Si bien es cierto que durante muchos años se ha considerado la AR como una enfermedad de tipo Th1, esta convicción se encuentra recientemente en entredicho. Y es que no sólo se ha observado que los niveles de interferón gamma (IFN- γ , citoquina implicada en la diferenciación de células T vírgenes hacia el fenotipo Th1) en la membrana o fluido sinovial de los pacientes de AR son muy bajas o nulas²⁹, sino que además se observa una aceleración de la artritis inducida por colágeno (CIA o *collagen induced arthritis*) en ratones carentes de genes como *Ifng* (*interferon gamma*), *Ifngr* (*interferon gamma receptor*) o *Il12a*³⁰⁻³² (*interleukin 12a*), muy importantes en la respuesta Th1. Todo ello, sumado a que se ha observado resistencia al desarrollo de CIA en ratones *Il6*^{-/-} e *Il23p19*^{-/-} (*interleukin 23 alpha subunit p19*) y que este modelo murino de la enfermedad mejora o empeora con la inhibición o la sobre-expresión de IL-17 respectivamente, explica la relevancia otorgada recientemente a las células Th17 en la patogenia de la AR³²⁻³⁴.

Células B: la presencia de auto-anticuerpos en la AR y el éxito de terapias farmacológicas dirigidas hacia las células B (rituximab) implican a estas células en la enfermedad. Las células B también contribuyen a la patogenia de la AR mediante la producción de quimiocinas e interleucinas (como IL-6, IL-10 y LT- β (*lymphotoxin-beta*)) que favorecen la activación de células dendríticas foliculares y la neogénesis linfoide³⁵.

Células dendríticas: son la principal fuente de presentación antigénica a los linfocitos T (LT) y pueden secretar también citoquinas implicadas en el proceso inflamatorio.

Macrófagos: son capaces de liberar una gran variedad de citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IL-6, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-18, HMGB1 (*high-mobility group box 1*) y MIF (*macrophage migration inhibitory factor*)) al detectar patrones moleculares repetitivos presentes en microorganismos (a través de los TLRs (*Toll like receptors*)), inmunocomplejos (a través de Fc γ Rs (*Fc receptor for IgG*)) o ciertas proteasas (PAR2 o *protease-activated receptor 2*). El TNF es una molécula especialmente relevante en la patogenia de la AR, tal y como demuestran los estudios farmacológicos^{36,37}. No en vano, muchos de los factores genéticos recientemente identificados parecen estar implicados en vías activadas por TNF^{38,39} y el bloqueo farmacológico de esas vías mejora la clínica de la AR en el 70% de los pacientes. El TNF induce la activación del endotelio, leucocitos, fibroblastos y la angiogénesis.

Neutrófilos: la activación de este subtipo celular, ampliamente distribuido en la membrana sinovial afectada de AR, es uno de los principales responsables del daño tisular al liberar citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IL-6, IL-15, IL-1, IL-18 y BAFF (*B-cell activating factor belonging to the TNF family*)), quimiocinas, prostaglandinas (PGs), metaloproteinasas de matriz (MMPs o *matrix metalloproteinases*) y reactivos intermediarios del nitrógeno y del oxígeno⁴⁰.

Mastocitos: existe una acumulación de mastocitos en el tejido sinovial que produce MMPs y citoquinas pro-inflamatorias.

Células NK (*natural killer*): muy numerosas en la membrana sinovial afectada de AR, se activan como consecuencia de la presencia de citoquinas (IL-15, IL-12 e IL-18) liberando compuestos citotóxicos y citoquinas proinflamatorias⁴¹ (como TNF e IFN- γ).

Células plaquetarias: aunque son comúnmente conocidas por su importante papel en el proceso de coagulación, cada vez se asocian con más fuerza al proceso inflamatorio. Recientemente se ha publicado que existen altas concentraciones de micropartículas plaquetarias en el fluido sinovial de pacientes de AR que podrían activar a los fibroblastos sinoviales al liberar IL-1 y así perpetuar la respuesta inflamatoria articular⁴².

1.2.2. Características histológicas del daño articular

En una fase temprana de la enfermedad se aprecia a nivel histológico edema tisular y acumulación de depósitos de fibrina que suelen manifestarse en el individuo afectado en forma de tumefacción y dolor en la articulación. Posteriormente, se produce hiperplasia e hipertrofia de la membrana sinovial con acumulación leucocitaria perivascular. La progresión del crecimiento celular, cuantitativo y cualitativo, puede ascender hasta la formación de 5-10 capas de sinoviocitos. La submucosa también sufre, con el tiempo, alteraciones hipertróficas e hiperplásicas con infiltración de células mononucleares, macrófagos y células plasmáticas. Las células endoteliales de los vasos sinoviales se transforman en vénulas endoteliales altas, permitiendo el tránsito de células leucocitarias desde la sangre a los tejidos.

En la fase crónica de la AR la infiltración linfocitaria es todavía mayor, y se observa una organización celular a modo de folículos linfoides con centros germinales. Además, en la ya ampliamente expandida mucosa sinovial, se observan dos subtipos celulares: sinoviocitos de tipo A (con capacidad fagocítica) y de tipo B (tipo-fibroblasto)⁴³. Esta inflamación crónica deriva en la formación del llamado *pannus*, un tejido de granulación compuesto por linfocitos, macrófagos, fibroblastos, sinoviocitos y mastocitos (Figura 2). La invasión del *pannus* es uno de los principales mecanismos responsables de daño del cartílago articular, las erosiones en el hueso subcondral y la afectación de las estructuras peri-articulares. Las células de la mucosa sinovial expresan altos niveles de MMPs. Posteriormente, el *pannus* se reemplaza por tejido fibroso compuesto por una capa poco vascularizada y cartílago.

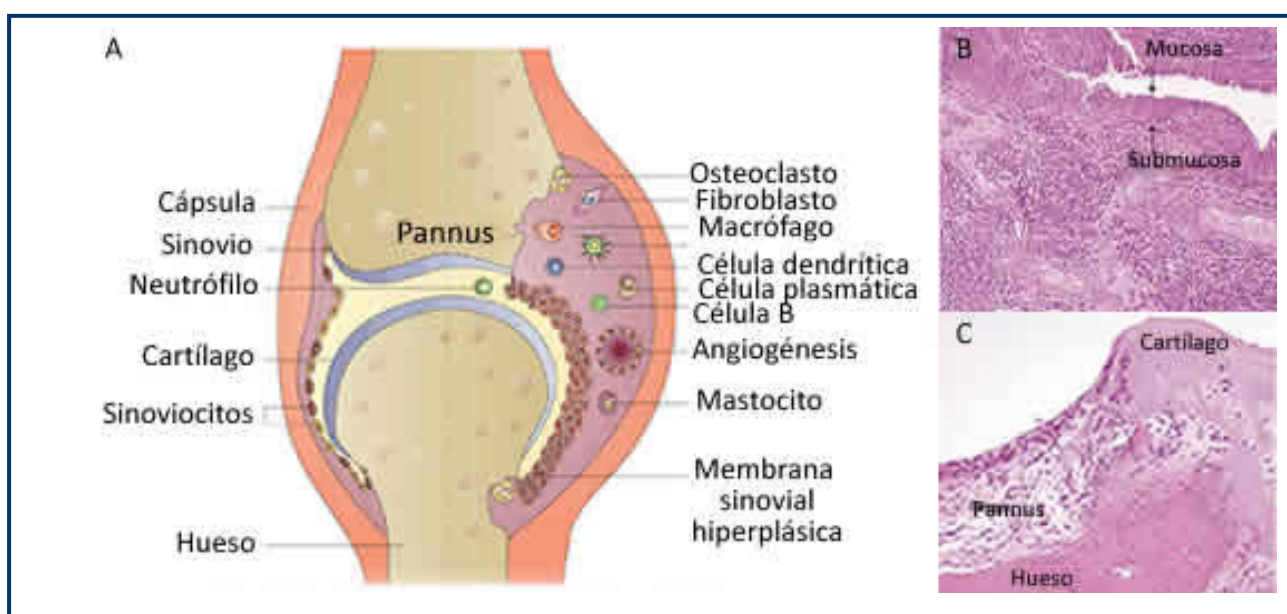


Figura 2: Articulación sinovial y tinciones de hematoxilina eosina de tejidos de articulaciones de pacientes con AR. La figura esquemática de la articulación (A) muestra en la parte izquierda el esquema de una articulación sinovial normal y en la parte derecha el esquema de una articulación sinovial afectada de AR. En las tinciones histológicas la figura B muestra el sinovio inflamado con hiperplasia de la mucosa sinovial y el infiltrado inflamatorio en la submucosa (ambos señalados por flechas). La figura C muestra el *pannus* invadiendo el hueso. Figura de la articulación obtenida de Strand *et al.*, 2007⁴⁴ y figuras histológicas obtenidas de Lee & Weinblatt, 2001⁴⁵.

1.2.3. Células articulares implicadas en la destrucción de la región

Osteoclastos: el proceso de formación y destrucción ósea se desequilibra en la AR (Figura 3). Los osteoclastos son las células responsables de la reabsorción ósea⁴⁶ y su diferenciación depende de las citoquinas M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) y RANKL (*receptor activator of NF- κ B (RANK)*)

ligand). M-CSF es producido por las células mesenquimales, sinoviales y Th1 en respuesta a citoquinas como TNF e IL-7, mientras que RANKL es expresado por células mesenquimales y células T activadas en respuesta a citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-17 y PGs.

Fibroblastos: los fibroblastos sinoviales de individuos afectados con AR se dividen de forma incontrolada al perder la capacidad de inhibición por contacto y juegan un importante papel en las fases de inflamación y destrucción articular⁴⁷. Los fibroblastos sinoviales contribuyen a la inflamación del tejido al liberar citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF) y favorecer la migración y activación de células T y B. También están implicadas en la destrucción del cartílago (producción de MMPs) y en la promoción de la angiogénesis (producen VEGF (*vascular endothelial growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), oncostatina M e IL-18). En la activación de los fibroblastos las citoquinas TNF e IL-1 β tienen un papel principal.

Condrocitos: el cartílago articular se compone de una capa superficial no mineralizada y otra más profunda mineralizada. Los condrocitos se encuentran en ambas capas y en el proceso patogénico de la AR sufren un cambio metabólico que les permite liberar enzimas catalíticas (ADAMTS (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) y MMPs) y citoquinas (IL-1 β , IL-17, IL-18 y TNF) que darán lugar a la destrucción del cartílago.

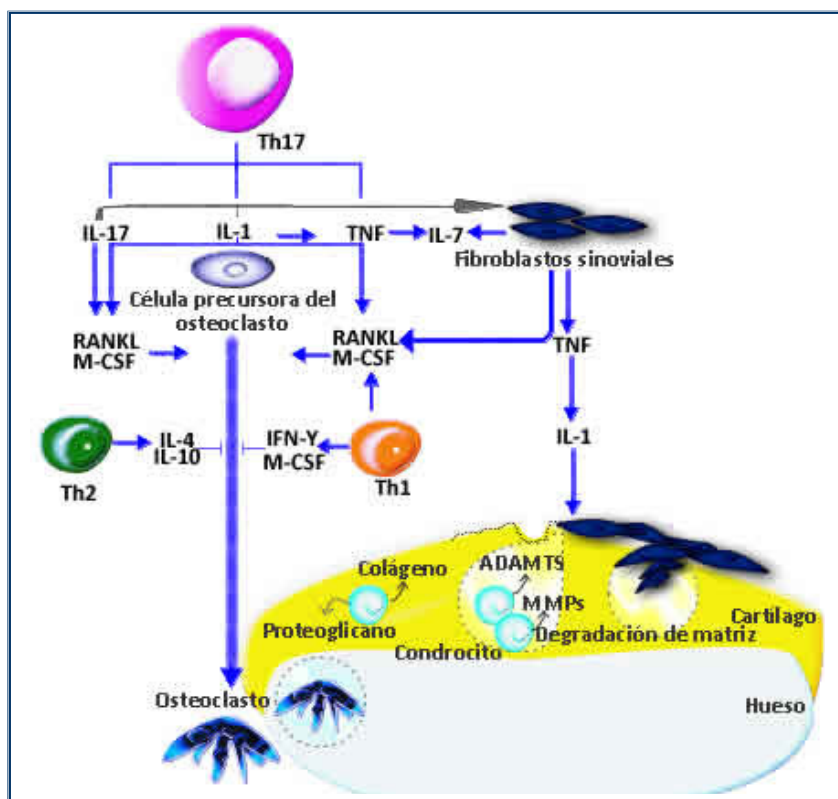


Figura 3: Factores clave implicados en la degradación del cartílago y del hueso subcondral. La degradación articular es un proceso complejo en el que se liberan enzimas degradadoras como ADAMTs y MMPs. Los fibroblastos sinoviales son activados por TNF e IL-1. Las citoquinas como IL-17 e IL-1 favorecen la activación de los condrocitos. La diferenciación de osteoclastos es un proceso dependiente de citoquinas cuyos principales mediadores son RANKL y M-CSF que son expresados por fibroblastos sinoviales y células Th1. La diferenciación de los osteoclastos se logra por la acción de TNF, IL-1, IL-17 e IL-7. La diferenciación de los osteoclastos se ve inhibida por IFN- γ , IL-4, IL-10 y M-CSF. Figura adaptada de McInnes & Schett, 2007²⁴.

1.3. Factores etiológicos de la artritis reumatoide

La AR es una enfermedad compleja en la que se encuentran implicados tanto factores ambientales como genéticos. Hasta el momento el único factor ambiental que ha sido asociado de forma convincente al desarrollo de la AR es el consumo de tabaco⁴⁸⁻⁵¹. Así, el riesgo de padecer AR es casi dos veces superior en individuos fumadores que en los no fumadores. Más concretamente, este riesgo está fuertemente correlacionado con el desarrollo de AR con serología positiva a anticuerpos anti-CCP y FR^{52,53}. Se cree que el tabaco favorece la citrulinación de proteínas y que los individuos con alelos codificantes del epítipo compartido (EC) (véase más adelante) estarían genéticamente predispuestos a producir anticuerpos anti-CCP⁵². Aún resta por determinar si agentes infecciosos (virus de *Epstein Barr*, *Retrovirus*, α -virus, virus de la *Hepatitis B*, *Mycobacterium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Mycoplasma*), factores hormonales (tratamiento con anticonceptivos orales), productos alimenticios (consumo de alcohol, dieta alta en ácidos grasos) u otros factores se asocian al desarrollo de la AR⁵⁴.

Los estudios en gemelos monozigóticos y dizigóticos demuestran que la AR presenta un importante componente genético, el cual se estima que explica hasta el 60% de la susceptibilidad a la enfermedad⁵⁵. El cuadro emergente propone la existencia de unas pocas variantes génicas con un efecto relativamente alto, y de muchas otras con un efecto muy débil sobre la enfermedad.

1.3.1. Estudio de genes *HLA*

El complejo principal de histocompatibilidad (*MHC* o *major histocompatibility complex*), que se localiza en la región 6p21 en los seres humanos y se extiende unas $4 \cdot 10^6$ pares de bases (pb), se organiza en regiones de clase I, II y III (Figura 4). Los genes que codifican para las cadenas α de las moléculas MHC de clase I y las cadenas α y β de las moléculas de MHC de clase II en los seres humanos reciben el nombre de *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*), al haber sido descubiertos a partir de las diferencias antigénicas que presentaban leucocitos de distintos individuos.

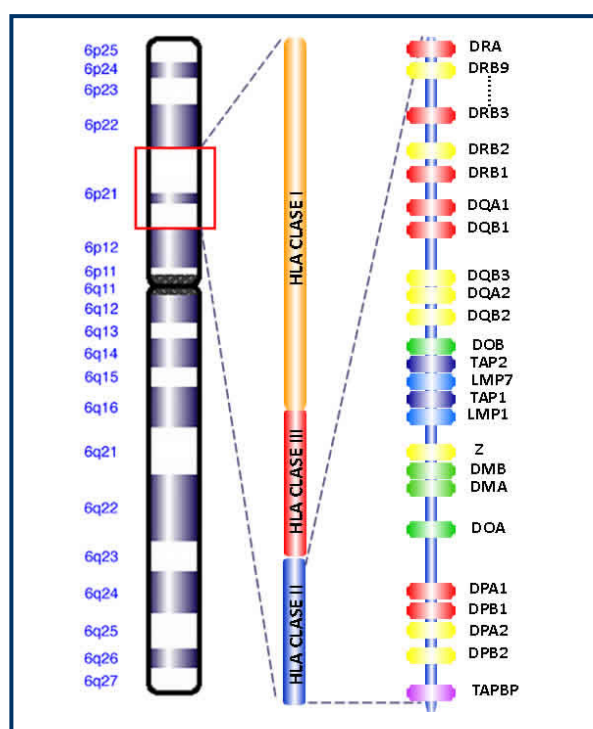


Figura 4: Distribución del MHC en el ser humano.

La región de *MHC* clase II comprende alrededor de 10^6 pb e incluye, entre otros, genes que codifican las cadenas α y β de las moléculas de clase II de presentación antigénica DP, DQ y DR. La subregión *DR* suele contener dos genes polimórficos que codifican la cadena β (*DRB1* y *DRB3/4/5*) y un gen monomórfico que codifica la cadena α (*DRA*).

La molécula de DR es un heterodímero α/β cuya variabilidad reside en las regiones hipervariables amino-terminales de la cadena β . Esta molécula es expresada por las APC y presenta péptidos antigénicos a los LT. La asociación de alelos en la tercera región hipervariable del gen *DRB1* con la AR, fue descrita hace ya más de 30 años⁵⁶. Actualmente, esta región del *HLA* de clase II se sigue considerando el principal factor genético de riesgo a la AR siendo responsable de un tercio de la susceptibilidad genética⁵⁷. Los alelos de *HLA-DRB1* asociados con la AR (*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *1001, *1402) codifican una misma secuencia aminoacídica y son conocidos como los alelos del epítipo compartido⁵⁸ (Tabla 1). Este término hace alusión a una teoría del mismo nombre, que postula la implicación de las moléculas de HLA de clase II portadoras de estos alelos (Figura 5) con la etiopatogenia de la enfermedad. Además se ha asociado la presencia del EC con la producción de anticuerpos anti-CCP y mayor severidad a la enfermedad⁵⁹.

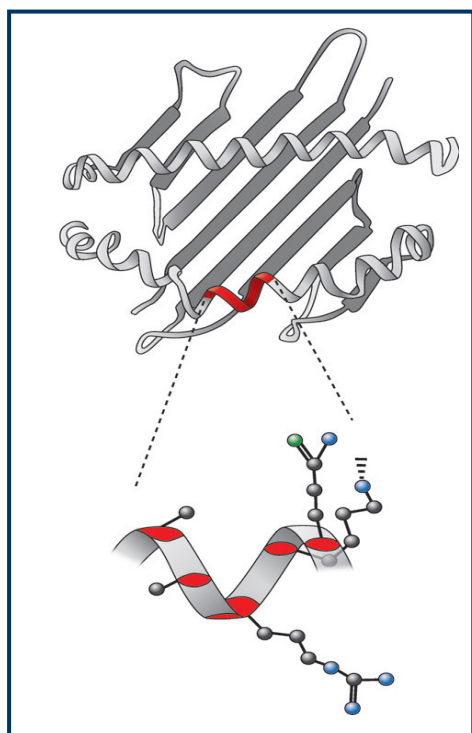


Figura 5: Esquema del epítipo compartido. Basado en estudios cristalográficos de una molécula de *HLA-DRB1 401**. Figura obtenida de Imboden, 2009⁶⁰.

Tabla 1: Determinación de los alelos codificantes del epítipo compartido según los aminoácidos presentes en la tercera región hipervariable de la cadena β de la molécula DR.

Alelo	Posición aminoacídica				Asociación con AR
	67	70	71	74	
<i>DRB1*0101</i>	L	Q	R	A	Sí
<i>DRB1*0102</i>	L	Q	R	A	Sí
<i>DRB1*0103</i>	I	D	E	A	No
<i>DRB1*0401</i>	L	Q	K	A	Sí
<i>DRB1*0402</i>	I	D	E	A	No
<i>DRB1*0403</i>	L	Q	R	E	No
<i>DRB1*0404</i>	L	Q	R	A	Sí
<i>DRB1*0405</i>	L	Q	R	A	Sí
<i>DRB1*0406</i>	L	Q	R	E	No
<i>DRB1*0408</i>	L	Q	R	A	Sí
<i>DRB1*1001</i>	L	R	R	A	Sí
<i>DRB1*1402</i>	L	Q	R	A	Sí

L=leucina; Q=glutamina; R=arginina; A=alanina; K=lisina. La sustitución de alguno de ellos por los aminoácidos cargados negativamente (D=ácido aspártico y E=ácido glutámico), altera la asociación con la AR.

1.3.2. Estudio de genes no-*HLA*

Los estudios en genética de la AR se han llevado a cabo mediante análisis de ligamiento y de asociación. Los primeros investigan la co-segregación del marcador y de la enfermedad en familias. Así, se estudian pares de hermanos afectados con la misma enfermedad (ASP o *affected sibling pairs*) o familias multiplex bajo la suposición de que al compartir segmentos cromosómicos es posible detectar el fragmento que contiene el *locus* de susceptibilidad. No en vano, el grado de agregación familiar (λ), o dicho de otro modo, el riesgo de que un pariente de un individuo afectado con AR presente la enfermedad en comparación con el riesgo de la población general es de $2-8^{61}$. Sin embargo, hay que tener en cuenta que si un factor de susceptibilidad no es ni necesario ni suficiente para producir una enfermedad, como ocurre en la mayoría de las enfermedades autoinmunes, entonces será difícil encontrar todos los factores genéticos implicados en una única estirpe familiar. Se cree que las familias se comportan como micro-poblaciones donde un factor de susceptibilidad puede ejercer un fuerte efecto en un linaje, pero tener escasa repercusión en otro.

Los estudios de asociación, sin embargo, comparan las frecuencias génicas de los marcadores en casos independientes y en controles, tratando de encontrar la correlación del marcador y el fenotipo enfermo de forma estadísticamente significativa. Con ello se pretende localizar el factor etiológico, aunque, es más común que la asociación detecte un marcador en desequilibrio de ligamiento (LD o *linkage disequilibrium*) con el factor causal de la enfermedad. Además, no es extraño encontrar resultados falsos positivos debido a errores de tipo I o a estratificación de la población. En este sentido, se han desarrollado distintas estrategias que minimizan el efecto de estratificación de la población, como la aplicación de estudios familiares TDT (*transmission disequilibrium test*) o el análisis comparativo de marcadores no ligados a la enfermedad que presenten diferentes frecuencias en las distintas poblaciones (control genómico) para comprobar si enfermos y controles son homogéneos étnicamente. En cualquier caso, los análisis de asociación pueden llegar a ser incluso más potentes que los análisis de ligamiento si consideramos el número de individuos genotipados. Además, no requieren el reclutamiento de familias, una tarea nada sencilla en AR debido a que la edad de comienzo de la enfermedad oscila entre los 35-50 años y que dificulta por tanto el poder contar con los progenitores del enfermo.

Resulta muy importante en este tipo de estudios la selección de las regiones genéticas objetivo de análisis. Si tenemos en cuenta que el genoma humano contiene aproximadamente unos 25000 genes, resulta imprescindible desarrollar estrategias que permitan pre-seleccionar los factores de susceptibilidad implicados en la AR. Los análisis de genes candidatos y los estudios de barrido genómico completo (GWAS o

Genome Wide Association Studies), son válidos para proponer e identificar genes de susceptibilidad, pero no debemos olvidar que la veracidad de la asociación de un factor genético a una enfermedad sólo se demuestra en su reproducibilidad en distintas poblaciones. A continuación se distinguen ambos enfoques.

1.3.2.1. Estudios de genes candidatos

En esta aproximación, la elección de los genes que han de analizarse se fundamenta en las bases bioquímicas de la enfermedad, modelos animales, purificados de proteínas implicadas, expresión diferencial de mRNA, marcadores asociados a enfermedades relacionadas, o regiones de ligamiento previamente descubiertas. Es decir, en los estudios de genes candidatos existe la hipótesis de que el gen en estudio podría estar implicado en la enfermedad. El uso de esta estrategia en AR facilitó la descripción de algunos marcadores de susceptibilidad no-HLA ampliamente reconocidos hoy en día (*PTPN22*⁶² (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*), *STAT4*⁶³ (*signal transducer and activation of transcription 4*), *PADI4*⁶⁴ (*peptidyl arginine deiminase, type 4*) y *CTLA4*⁶⁵ (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). En este sentido, los genes *CAPSL/IL7R* (*calcyphosine like/interleukin 7 receptor*), *CD40*, *PTGER4* (*prostaglandin E receptor 4*) y *CIITA/CLEC16A/SOCS1* (*class II major histocompatibility complex transactivator/C-type lectin domain family 16 member A/supressor of cytokine signaling 1*) parecen atractivos candidatos sobre los que llevar a cabo análisis de asociación en AR, ya que todos ellos codifican proteínas implicadas en la respuesta inmune y/o participan en procesos implicados en la patogenia de la enfermedad. Además, los marcadores presentes en todas estas regiones se han asociado a otras enfermedades autoinmunes en población caucásica, un hecho que no debemos infravalorar teniendo en cuenta que la AR comparte más del 70% de los genes de susceptibilidad descritos hasta la fecha con otras inmunopatías.

Concretamente, el análisis en esta tesis de la región *CAPSL/IL7R* se suscitó en primer lugar por la asociación previa de esta región a diabetes tipo 1⁶⁶ (DT1) y a esclerosis múltiple⁶⁷ (EM). Además, el gen *IL7R*, situado en la región 5p13.2, tiene una gran importancia en la respuesta inmune, pues codifica el receptor de la IL-7, que es esencial en la supervivencia y crecimiento de las células T. Finalmente, su expresión se ha relacionado con la actividad de la enfermedad a partir de estudios en células mononucleares de sangre periférica aisladas de pacientes de AR⁶⁸. Por otro lado, el análisis de la región 20q13.12, que incluye al gen *CD40*, se fundamentó en un estudio previo de asociación de este *locus* a la pérdida de masa ósea en mujeres postmenopáusicas⁶⁹. Teniendo en cuenta la potencial relevancia de este hecho en el proceso patológico de la AR y que el gen *CD40* codifica una proteína del mismo nombre muy importante en la co-estimulación de la activación de células T y B, decidimos incluir esta región en nuestro estudio. Así mismo, la región 5p13.1 contiene elementos reguladores de un gen que codifica un receptor de

prostaglandina, el gen *PTGER4*, y ha sido asociada a susceptibilidad a enfermedad de Crohn⁷⁰ (ECr). El hecho de que la PGE_2 (prostaglandina E_2) contribuya a la progresión de la CIA⁷¹, que sea un importante mediador de la inflamación⁷² y que las terapias con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) tengan éxito en el tratamiento de la AR^{73,74}, han propiciado la inclusión de esta región en nuestros análisis. Por último, la región 16p13 contiene genes candidatos como *CIITA*, que codifica elementos reguladores de la transcripción de moléculas de MHC de clase II, así como los genes *CLEC16A* y *SOCS1*. Mientras que *CLEC16A* codifica una proteína de función desconocida con un dominio estructural de tipo C que pudiera estar relacionado con el reconocimiento de patógenos, *SOCS1* codifica una proteína que inhibe la ruta de señalización inducida por IFN- γ . Además esta región se ha asociado a AR^{75,76}, DT1⁷⁷ y EM⁷⁵.

1.3.2.2. Estudios de barrido genómico

Los avances más recientes en biología molecular han permitido el desarrollo de una estrategia libre de hipótesis que está contribuyendo enormemente al conocimiento de la base genética de enfermedades autoinmunes mediante barridos genómicos completos. Estos estudios parten de la única suposición de que existen factores genéticos asociados a la enfermedad. En ellos se analizan hasta 500.000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs o *single nucleotide polymorphisms*) con una frecuencia del alelo minoritario (MAF o *minor allele frequency*) superior al 5%, distribuidos a lo largo del genoma (Figura 6).

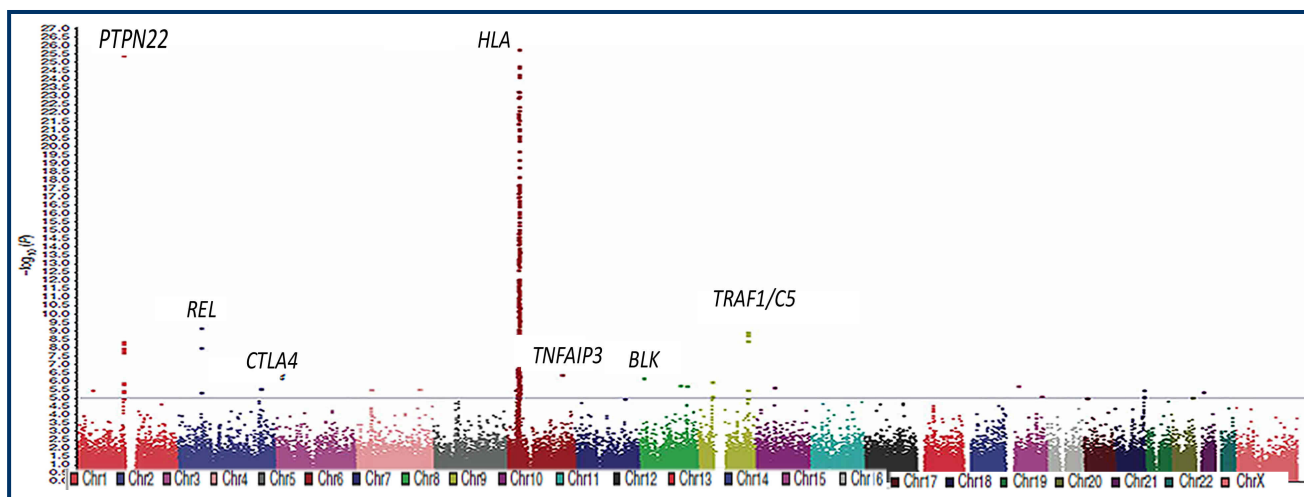


Figura 6: Resumen de los resultados obtenidos en un GWAS de AR en población norteamericana. Figura obtenida de Gregersen et al., 2009⁷⁸.

La potencia de estos estudios, que en su mayoría emplean muestras de miles de pacientes y controles, queda limitada por la fuerte corrección de tests múltiples a la que debe enfrentarse. Por ello, también se llevan a cabo estudios de meta-análisis y de asociación de los SNPs nominalmente significativos en los GWAS (*follow-up*) que permiten describir más marcadores asociados. Gracias a los GWAS se han producido grandes avances en la genética de la AR en los últimos tres años, detectándose genes de susceptibilidad que difícilmente se hubieran considerado principales candidatos (para consultar todos los genes de susceptibilidad no-*HLA* actualmente asociados a AR ver Tabla 2). La replicación de los resultados obtenidos a través de estudios GWAS son esenciales para establecer la veracidad de la asociación de un marcador con la enfermedad. Además, las diferencias en el LD existentes en distintas poblaciones pueden provocar diferencias en el establecimiento del mejor marcador de la enfermedad en cada una de ellas. Así pues, parece necesario llevar a cabo estudios de replicación de los polimorfismos descritos en los GWAS y validarlos en población española. En este sentido hemos analizado cuatro polimorfismos en la región cromosómica de *TRAF1/C5* (*TNF receptor-associated factor 1/complement component 5*) que han sido asociados a AR en otras poblaciones caucásicas^{79,80}. También estudiamos dos polimorfismos situados en la región 6q23 que han sido asociados a la susceptibilidad a AR en pacientes con serología positiva frente a anticuerpos anti-CCP y FR en dos estudios independientes de barrido genómico^{81,82}.

Tabla 2: Factores genéticos asociados y validados hasta la fecha en AR.

Locus	Localización cromosómica	SNP	Función	Citas	Otras enfermedades asociadas
<i>CD2/CD58</i>	1p13.1	rs11586238	Molécula co-estimuladora de células T y NK	83	EM ⁸⁴
<i>PTPN22</i>	1p13.2	rs2476601	Señalización a través de BCR (<i>B-cell receptor</i>) y TCR (<i>T-cell receptor</i>)	62	LES ⁸⁵ , EG ⁸⁶ , AIJ ⁸⁷ , VG ⁸⁸ , GW ⁸⁹ , MG ⁹⁰ , DT1 ⁹¹
<i>PADI4</i>	1p36.13	rs2240340	Citrulinación enzimática de péptidos	64	-----
<i>TNFRSF14</i>	1p36.32	rs3890745/ rs10910099	Co-estimulación de las células T	38,39,92	ECe ⁹³
<i>FCGR2A</i>	1q23	rs12746613	Fagocitosis y eliminación de inmunocomplejos	83	CU† ⁹⁴ , LES ⁹⁵
<i>PTPRC</i>	1q31	rs10919563	Regulador de la activación del TCR y BCR, crecimiento celular, diferenciación, mitosis, transformación oncogénica, etc...	83	EG† ⁹⁶
<i>REL</i>	2p13	rs13031237	Factor de transcripción miembro de la familia Rel/NF-κB (<i>nuclear factor κB</i>)	78,97	ECe ⁹⁸
<i>AFF3</i>	2q11.2	rs10865035	Factor nuclear con dominios de activación de transcripción	92,99	DT1 ⁶⁶ , AIJ ¹⁰⁰
<i>CD28/CTLA4</i>	2q33.2	rs1980422/rs3087243	Molécula co-estimuladora en células T/Regulador negativo de la activación de células T	83,101	DT1 ¹⁰² , ETA ¹⁰³ , ECe ¹⁰⁴
<i>STAT4</i>	2q33.3	rs7574865	Transducción y activación de la transcripción de citoquinas tipo IFN-I e IL-12, IL-23, IL-15	63	LES ¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ , DT1 ¹⁰⁹ , AIJ ¹¹⁰
<i>IL2/IL21</i>	4q27	rs6822844	*Regulación de células T en enfermedades autoinmunes	111	DT1 ⁹² , ECe ¹¹² , PsA ¹¹³ , EII ¹¹⁴ , AIJ ¹¹⁵
<i>PRDM1/BLIMP1</i>	6q21	rs548234	Factor de transcripción implicado en la diferenciación de células B a células plasmáticas	83	-----
<i>TNFAIP3</i>	6q23	rs10499194 /rs6920220	Enzima de ubiquitinización; inhibidor señalización TNFR (<i>TNF receptor</i>)/NF-κB	81,82	AIJ ¹¹⁰ , LES ¹¹⁶ , Ps ¹¹⁷ , DT1 ¹¹⁸ , ECe ⁹⁸
<i>TAGAP</i>	6q25	rs394581	Modulación de cambios en el citoesqueleto	83	DT1 ¹¹⁹ , ECe ¹²⁰
<i>CDK6</i>	7q21	rs42041	Kinasa dependiente de ciclina reguladora de la progresión del ciclo celular	38	-----
<i>CCL21</i>	9p13	rs2812378	Quimiocina de atracción de los linfocitos a órganos linfoides	38	-----
<i>TRAF1/CS</i>	9q33.2	rs3761847	Regula señalización por TNFR/NF-κB	80,121	AIJ ¹²² , LES ¹²³
<i>PRKCQ</i>	10p15	rs4750316	Proteína quinasa implicada en la activación de las células T	38,39	DT1 ¹²⁴
<i>TRAF6/RAG1</i>	11p12	rs540386	Factor implicado en la activación de NF-κB	83	-----
<i>KIF5/PIP4K2C</i>	12q13	rs1678542	Señalización a través del BCR	38,39	DT1 ¹²⁵
<i>CD40</i>	20q13	rs4810485	Co-estimulación células B/T; "Switching", producción de TNF e IL-2 vía NF-κB	38	EM ¹²⁶ , EG ¹²⁷
<i>IL2RB</i>	22q12.3	rs3218253/rs743777	Activación y regulación de las células T	39,92	-----

LES= lupus eritematoso sistémico; EG= enfermedad de Graves; AIJ= artritis idiopática juvenil; VG= vitíligo generalizado; GW= granulomatosis de Wegener; MG= miastenia gravis; DT1=diabetes tipo 1,

Ps= psoriasis; ECe= enfermedad celíaca; ETA= enfermedad tiroidea autoinmune; ECr= enfermedad de Crohn; CU= colitis ulcerosa; EII= enfermedad inflamatoria intestinal; PsA= artritis psoriásica;

†= población japonesa; * se refiere a la actividad de la IL-2.

1.3.2.3. Estudios de interacciones genéticas

A pesar de los grandes avances obtenidos recientemente en el conocimiento de la base genética de la AR, se estima que sólo podemos explicar un 5% más de la heredabilidad total de la enfermedad que hace tres años, cuando se publicaron los primeros GWAS. Por ello se piensa que deben existir otros factores hereditarios, como SNPs de baja frecuencia, microsatélites, variaciones del número de copias (CNVs o *copy number variations*), interacciones genético-ambientales e interacciones gen-gen implicados en la susceptibilidad a la AR.

Nosotros hemos centrado los esfuerzos en la investigación de la AR tras la era GWAS en la búsqueda de interacciones genéticas. Las principales dificultades en la consecución de los estudios de interacción recaen en el tratamiento de las ingentes cantidades de datos y en la corrección estadística que de su análisis se desprende. Por esta razón, de nuevo, deben emplearse estrategias que permitan la detección de interacciones, bien por análisis de candidatos o por estudios a gran escala. La búsqueda de interacciones genéticas en estudios libres de hipótesis puede realizarse a través de análisis estratificados, MDR¹²⁸ (*multifactor dimensionality reduction*), GTD¹²⁹ (*genotype-trait distortion*) o bases estadísticas fundamentadas en el LD de genes no ligados¹³⁰. Esta última aproximación implica conceptos muy interesantes como el LD y la penetrancia. De forma clásica, existe LD entre alelos de dos *loci* distintos cuando la probabilidad de que se hereden de forma conjunta es superior a la esperada por azar. Intuitivamente, una interacción indica la acción conjunta de dos genes en el desarrollo de una enfermedad, lo que implica que algunos “haplotipos” derivados de los *loci* que interaccionan, ocurren más frecuentemente en la población enferma de lo que cabría esperar. De acuerdo con esta hipótesis, la interacción de dos *loci* puede asimilarse a la aparición de LD en la población enferma y su magnitud será proporcional a la fuerza de la interacción. Esta forma de medir la interacción genética implica que la penetrancia de los genes en interacción es muy superior a la penetrancia de cada uno de los marcadores medidos de forma independiente, y que podemos diferenciar subgrupos de enfermos en los que la co-presencia de alelos de susceptibilidad podría contribuir al desarrollo de la enfermedad o a distinguir fenotipos (severidad de la enfermedad o respuesta a un tratamiento) en la tan variable inmunopatía de la AR.

Hasta el momento sólo se ha descrito una epistasis entre genes candidatos (*IL1–SELS* o *interleukin 1-selenoprotein S*)¹³¹ y se han propuesto algunas interacciones genéticas a partir de estudios sin hipótesis previa¹³². Dada la potencial relevancia de las interacciones genéticas en la AR, parece importante realizar más estudios de este tipo e intentar replicar la veracidad de las que ya han sido propuestas. Nosotros

tratamos de replicar las interacciones descritas entre polimorfismos que se encuentran en los *loci* *IL1-SELS* y *RTN4-GLIS3* (*reticulon 4-GLIS family zink finger*). Además, nuestro trabajo incluye dos propuestas de interacción en AR, la primera, entre marcadores asociados a *TNFRSF14* (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 14*) y *TNFRSF6B* (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 6b*) y la segunda entre el gen *FOXP3* (*forkhead box P3*) con *CTLA4*, *CD40* ó *IL2*.

La primera interacción que proponemos implica polimorfismos localizados en las regiones genéticas 1p36 y 20q13 que incluyen los genes *TNFRSF14* y *TNFRSF6B*, respectivamente. El gen *TNFRSF14* codifica la proteína TNFRSF14 (también conocida como HVEM (*herpesvirus entry mediator*)), que juega un importante papel en la co-estimulación de las células T al interaccionar con su ligando LIGHT (*homologous to lymphotoxins exhibiting inducible expression and competes with HSV glicoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes*). Polimorfismos adyacentes a *TNFRSF14* se han asociado recientemente a AR^{38,39}. También se han asociado recientemente polimorfismos localizados en la región que incluye al gen *TNFRSF6B* a enfermedad inflamatoria intestinal (EII)¹³³. Curiosamente el gen *TNFRSF6B* codifica otro miembro de la superfamilia de receptores del TNF, el TNFRSF6B (también conocido como DcR3 (*decoy receptor 3*)), que es una proteína soluble capaz de unirse a FasL (oficialmente TNFSF6 o *TNF superfamily, member 6*), TL1A (*TNF-like cytokine 1A*) y a la ya mencionada molécula LIGHT. La proteína TNFRSF6B ha sido relacionada con la actividad osteoclástica¹³⁴, inhibición de la apoptosis¹³⁵ y modulación de la activación y diferenciación de las células T por competición con TNFRSF14 o a través de señalización reversa¹³⁶. Puesto que ambos genes codifican miembros de la superfamilia de receptores del TNF, dichas proteínas comparten un ligando común cuyos niveles además se encuentran aumentados en el sinovio de pacientes con AR¹³⁷, y ambos SNPs han sido asociados a enfermedades autoinmunes, creemos que ambos genes pueden interaccionar para generar susceptibilidad en un subgrupo de enfermos de AR.

La segunda interacción candidata implica al gen *FOXP3*, que es el principal factor de transcripción implicado en el desarrollo y función de las células Treg CD4⁺CD25⁺. Estas células regulan la respuesta inmune en la periferia suprimiendo la activación, la expansión clonal y/o la función efectora de las células T auto-reactivas, células B y macrófagos, y también regulando la inmunogenicidad de las APC¹³⁸. Se ha observado un alto número de células Treg CD4⁺CD25⁺ en el fluido sinovial de pacientes con AR, pero su capacidad para limitar la artritis parece insuficiente. Por ello se postula que existan alteraciones en la función de las células Treg que pudieran estar implicadas en el desarrollo de la AR. Esta idea es apoyada por un estudio realizado por Ehrenstein *et al.*³⁷, en el que se describe la capacidad de las células CD4⁺CD25⁺ de sangre periférica de pacientes con AR para proliferar, pero no para suprimir la producción de citoquinas

pro-inflamatorias. Puesto que estudios previos no han evidenciado asociación de *FOXP3* con AR¹³⁹, nosotros postulamos que la implicación de este gen en AR puede verse influenciada por otros factores genéticos implicados en la regulación de la función de las células Treg. Así, se ha descrito que la capacidad supresora de las células Treg CD4⁺CD25⁺ puede verse alterada por los niveles de IL-2¹⁴⁰ y que los mecanismos de regulación de las células Treg CD4⁺CD25⁺ parecen ser dependientes de contacto directo con las células implicadas, siendo la interacción de CD80/CD86 con CTLA4 indispensable¹⁴¹. Además, en la interacción Treg con APC, se produce una disminución en la expresión de moléculas co-estimuladoras, lo que inhibe las propiedades inmunogénicas de las APC. Proponemos pues que exista interacción genética del gen *FOXP3* con los genes *IL2*, *CTLA4* y *CD40*.

En esta tesis también se realiza el análisis de interacciones sin hipótesis previa entre marcadores ya analizados en estudios de asociación con AR de manera independiente y que se encuentran implicados en la respuesta inflamatoria.

4 OBJETIVOS

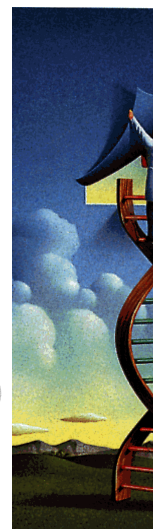


El objetivo general de este trabajo es identificar factores genéticos de susceptibilidad asociados con la AR o con algún subgrupo determinado de ésta en población española. Dichos subgrupos se determinan según características fenotípicas (sexo o presencia/ausencia de autoanticuerpos (anti-CCP o FR)) o genéticas (presencia/ ausencia del EC u otras variantes genéticas). Además se investigan interacciones genéticas que pudieran contribuir a explicar parte de la heredabilidad de la AR. Nuestros objetivos concretos han sido:

1. Determinar en población española la asociación con determinadas subclases de AR y/o con la enfermedad global, de los marcadores localizados en las regiones que contienen los siguientes genes candidatos:
 - 1.1. *CAPSL/IL7R*.
 - 1.2. *CD40*.
 - 1.3. *PTGER4*.
 - 1.4. *CIITA/CLEC16A/SOCS1*.
2. Replicar en nuestra población la asociación de marcadores previamente descritos en GWAS de AR. Además, se intenta establecer si la asociación se encuentra restringida o no a un subgrupo de enfermos de AR. Las regiones genéticas analizadas son las que contienen los genes:
 - 2.1. *TRAF1/C5*.
 - 2.2. *OLIG3/TNFAIP3*.
3. Determinar la existencia de interacciones genéticas que pudieran encontrarse asociadas a subgrupos de AR en población española:
 - 3.1. Entre *loci* candidatos:
 - 3.1.1. *TNFRSF14-TNFRSF6B*.
 - 3.1.2. *FOXP3* con *CTLA4*, *CD40* e *IL2*.
 - 3.2. Entre marcadores que han generado epistasis según la bibliografía, pero cuya replicación no ha sido publicada. Dichos marcadores se encuentran en las regiones donde se localizan los genes:
 - 3.2.1. *IL1-SELS*.
 - 3.2.2. *RTN4-GLIS3*.
 - 3.3. Entre 43 marcadores pertenecientes a 17 regiones cromosómicas distintas asociadas a procesos inflamatorios.

5

MATERIALES Y MÉTODOS



1.4. Origen de las muestras

Todas las muestras analizadas proceden de sangre periférica de individuos sanos y enfermos de AR, no relacionados, de origen y ascendencia española. Las muestras control proceden de donantes de sangre y trabajadores del Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Madrid, que no padecían, ni tenían ningún familiar en primer grado que padeciera enfermedades autoinmunes. Las muestras de enfermos de AR proceden de pacientes diagnosticados según los criterios del ACR que acudían regularmente a la consulta del Servicio de Reumatología del HCSC. Las características clínicas del grupo de pacientes de AR analizado son las siguientes: 74% mujeres, 56% EC positivo, 52% anticuerpos anti-CCP positivo y edad media de debut 51 ± 15 años. También se analizaron muestras de pacientes de AR del Hospital Universitario la Paz (HULP), Madrid, con fines de replicación en la mayoría de los casos. Las características clínicas de estos pacientes eran 76% mujeres y 64% EC positivo.

Los Comités Éticos de los hospitales implicados aprobaron los estudios, y todos los participantes proporcionaron consentimiento informado para ser incluidos en los mismos, tal y como indica la declaración de Helsinki. Los datos codificados de estos individuos fueron incluidos en una base de datos de Microsoft Office Access. El número de individuos incluidos, tanto de controles como de pacientes de AR, ha aumentado con el transcurso de los años, por lo que su número varía entre estudios.

1.5. Extracción, cuantificación y dilución de DNA

Las muestras de DNA se obtuvieron a partir de sangre periférica mediante la técnica de “*salting out*”¹⁴². En esta técnica se recoge la fase leucocitaria de la sangre y se resuspende en *buffer* de lisis nuclear para después digerir las proteínas con proteinasa K. La precipitación del DNA se realiza en etanol y posteriormente se resuspende en una solución de TE (Tris-HCl, EDTA). Las muestras de DNA (DNA *stock*) se almacenaron a -80°C . La cuantificación de DNA se llevó a cabo con un espectrofotómetro (NANODROP 1000, *Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del DNA en todas las muestras oscila entre 1,7-1,8 considerando el cociente 260/280 nm. Se llevaron a cabo diluciones de DNA (diluciones de trabajo) con agua destilada hasta que las muestras quedaron a una concentración de 10 ng/ μl , y se almacenaron a 4°C .

1.6. Detección de anticuerpos en pacientes de artritis reumatoide

1.6.1. Detección del factor reumatoide

La detección del FR se realizó por nefelometría cinética (IMMAGE®, *Immunochemistry Systems, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA*). En esta técnica se agrega IgG humana al suero de pacientes, generando inmunocomplejos con el FR, si lo hubiera. Se mide en el tiempo el incremento de la dispersión de la luz que resulta de la reacción del FR y la IgG agregada, y al final de la reacción el sistema calcula la velocidad de cambio de la señal de dispersión y estima la concentración de FR en la muestra. Valores superiores a 60 U/ml se consideran positivos.

1.6.2. Detección de anticuerpos anti-CCP

La detección de anticuerpos anti-CCP se realizó mediante enzimoimmunoanálisis (*Immunoscan RA Anti-CCP test kit, EURO-DIAGNOSTICA, Medeon, Malmö, Sweden*). En esta técnica los pocillos de microplacas comerciales se encuentran recubiertos con péptidos citrulinados sintéticos a los que se unen los anticuerpos específicos de los pacientes, si los hubiera en el suero. La unión antígeno-anticuerpo es detectada por anticuerpos anti-IgG humana marcados con peroxidasa de rábano picante. Al añadir un sustrato, la respuesta química genera un cambio de color en el pocillo que es proporcional al título de anticuerpos anti-CCP presentes. La detección se realiza por absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. Las muestras con una concentración ≥ 25 U/ml se definen como positivas.

1.7. Elección de los marcadores estudiados

Se llevaron a cabo análisis de asociación en los que se estudiaron SNPs que se localizaban en genes candidatos o *loci* previamente asociados a AR por GWAS (ver Tabla 3). También hemos llevado a cabo análisis de interacción con y sin hipótesis previa. Los análisis de interacción con hipótesis previa incluyen el estudio de SNPs y microsatélites que también se presentan en la Tabla 3. En los análisis sin hipótesis previa se estudian 43 SNPs localizados en genes implicados en el desarrollo de la respuesta inmune, por lo que los hemos incluido en una tabla distinta (Tabla 4).

La elección de un grupo de SNPs en una misma región genética se basó en el análisis del LD¹⁴³ de la zona utilizando la correlación al cuadrado entre pares de SNPs (r^2) con el programa Haploview 4.0 ($r^2 < 0,8$). Los SNPs así seleccionados reciben el nombre de *tagging* SNPs o *tag* SNPs y resultan muy informativos, si bien es cierto que en su elección no se tienen en cuenta SNPs con MAFs menores del 5% y que el número

de SNPs seleccionados depende además de lo bien estudiada que se encuentre la zona. La Figura 7 muestra la relación de LD, D' y r^2 de los polimorfismos estudiados que se localizan en una misma región genética.

Tabla 3: Marcadores genéticos estudiados en los análisis de asociación e interacciones gen-gen candidatas.

Marcador	Gen	Banda Cromosómica	Posición	MA	MAF en controles	HWE
rs6684865	<i>MMEL1/TNFRSF14</i>	1p36.32	2536089	A	0,331	0,33
rs17046477	<i>SPTBN1/RTN4</i>	2p16.1	54982652	G	0,109	0,05
rs16944	<i>IL1B</i>	2q13	113311338	A	0,317	0,54
rs13422767	<i>FAP/IFIH1/KCNH7</i>	2q24.2	162808505	A	0,188	0,04
rs3087243	<i>CTLA4</i>	2q33.2	204447164	G	0,490	0,57
rs6822844	<i>TENR/IL2</i>	4q27	123728871	T	0,134	0,21
rs17234657	<i>DAB2/PTGER4</i>	5p13.1	40437266	G	0,117	0,10
rs6896969			40460183	A	0,376	0,94
rs6871834			40515944	G	0,354	0,86
rs6897932	<i>CAPSL/IL7R</i>	5p13.2	35910332	T	0,258	0,42
rs987106			35911350	A	0,468	0,10
rs3194051			35912031	G	0,297	0,09
rs1010601			35943961	G	0,409	0,20
rs1445898			35946286	A	0,455	0,77
rs10499194	<i>OLIG3/TNFAIP3</i>	6q23	138044330	T	0,322	0,82
rs6920220			138048197	A	0,191	0,87
rs7033413	<i>RFX3/GLIS3</i>	9p24.2	3798284	A		0,57
rs13440146	<i>TRAF1/C5</i>	9q33.2	122721272	T	0,064	0,88
rs2269059			122722293	A	0,071	0,63
rs3761847			122730060	G	0,362	0,34
rs2416806			122730113	G	0,297	0,27
rs3020444	<i>ESR2</i>	14q23.2	63860766	C	0,375	0,21
rs28665122	<i>SELS</i>	15q26.3	99635250	T	0,150	0,34
rs3087456	<i>CIITA</i>	16p13.13	10878403	G	0,244	0,98
rs4774			10908349	C	0,263	0,84
rs2903692	<i>CLEC16A/SOCS1</i>	16p13.13	11146284	A	0,416	0,30
rs6498169			11156830	G	0,322	0,21
rs11074956			11245222	T	0,394	0,15
rs1883832	<i>CD40</i>	20q13.12	44180389	T	0,270	0,16
rs4809330	<i>ZGPAT/TNFRSF6B</i>	20q13.33	61820030	A	0,294	0,33
rs755622	<i>MIF</i>	22q11.23	22566392	C	0,130	0,10
Microsatélite GTn	<i>FOXP3</i>	Xp11.23	-----	---	-----	-----
rs2294020			48990168	A	0,227	0,67
rs2280883			48996072	C	0,489	0,78
rs4824747			49015967	T	0,125	0,15

MA= alelo minoritario; MAF= frecuencia del alelo minoritario; AR= artritis reumatoide; HWE= equilibrio de Hardy-Weinberg.

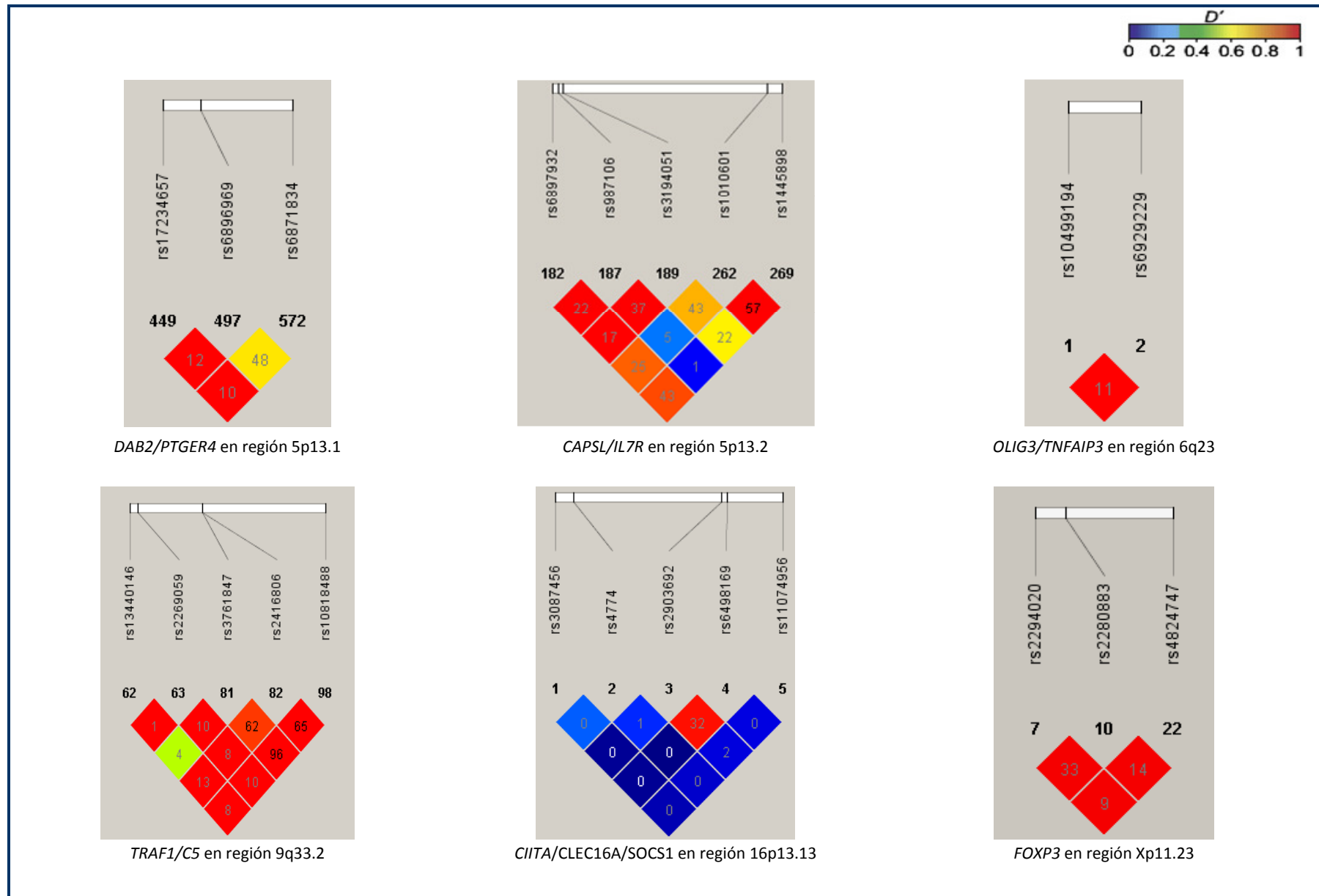


Figura 7: Relación entre polimorfismos analizados en una misma región genética. El desequilibrio de ligamiento medido como D' en color y el r^2 en el interior del rombo.

Tabla 4: Polimorfismos incluidos en el análisis de interacciones genéticas sin hipótesis previa en pacientes españoles de AR.

Marcador	Gen	Localización	Posición	MA	MAF en controles	HWE	Citas
rs2476601	<i>PTPN22</i>	1p13.2	114179091	A	0,066	0,98	62
rs7517847	<i>IL23R</i>	1p31.3	67454257	G	0,375	0,70	144
rs11209026			67478546	A	0,055	0,54	
rs2240340	<i>PADI4</i>	1p36.13	17535226	A	0,430	0,99	145
rs1748033			17535249	A	0,389	0,88	
rs13422767	<i>FAP/IFIH1/KCNH7</i>	2q24.2	162808505	A	0,188	0,04	146
rs1990760			162832297	C	0,412	0,68	
rs2068330			162945636	C	0,395	0,84	
rs11938795	<i>TENR/IL2</i>	4q27	123292459	C	0,286	0,21	111
rs17388568			123548812	A	0,277	0,75	
rs1445898	<i>CAPSL/IL7R</i>	5p13.2	35946286	A	0,455	0,77	66
rs987106			35911350	A	0,468	0,10	
rs1010601			35943961	G	0,409	0,20	
rs6897932			35910332	T	0,258	0,42	
rs3194051			35912031	G	0,297	0,09	
rs2243250							
rs1050152	<i>IL4/ SLC22A4/IL12B</i>	5q31.1-5q33.3	132037053	T	0,176	0,18	147
rs3212227			131704219	T	0,445	0,40	
rs6887695			158675528	C	0,236	0,80	
			158755223	C	0,338	0,29	
rs9340799	<i>ESR1</i>	6q25.1	152205074	G	0,369	0,15	148
rs2234693			152205028	C	0,448	0,99	
rs688136	<i>VIP</i>	6q25.2	153121754	C	0,358	0,97	149
rs3823082			153116015	A	0,237	0,70	
rs662	<i>PON1</i>	7q21.3	94775382	A	0,298	0,87	150
rs854560			94784020	G	0,423	0,72	
rs2430561	<i>IFNg</i>	12q15	66838789	A	0,442	0,42	151
rs3020444	<i>ESR2</i>	14q23.2	63860766	C	0,375	0,21	148
rs11327127	<i>SELS</i>	15q26.3	99635683	delT	0,223	0,79	152
rs28665122			99635250	T	0,150	0,34	
rs4965814			99631440	C	0,193	0,68	
rs12917258			99630862	G	0,339	0,10	
rs4965373			99629918	A	0,303	0,97	
rs2101171			99625438	C	0,240	0,51	
rs3087456	<i>CIITA</i>	16p13.13	10878403	G	0,244	0,98	75
rs4774			10908349	C	0,263	0,84	
rs2779251	<i>NOS2A</i>	17q11.1	23155453	A	0,150	0,54	153
rs2779248			23151959	C	0,375	0,42	
rs1137933			23130059	T	0,220	0,32	
rs2297518			23120724	A	0,195	0,84	
rs3729508			23133157	A	0,500	0,48	
rs143383	<i>GDF5</i>	20q11.22	33489397	C	0,431	0,20	154
rs143384			33489170	C	0,469	0,78	
rs755622	<i>MIF</i>	22q11.23	22566392	C	0,130	0,10	155

MA= alelo minoritario; MAF= frecuencia del alelo minoritario; AR= artritis reumatoide; HWE= equilibrio de Hardy-Weinberg.

1.8. Genotipado

1.8.1. Polimorfismos de un solo nucleótido

El genotipado de SNPs fue realizado mediante tecnología TaqMan® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) en un equipo de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR o *real time-polymerase chain reaction* (*Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System*)). Los ensayos TaqMan constan de cebadores o *primers* (*reverse* y *forward*) y sondas específicas. Estas últimas son unas secuencias de unas 13 bases marcadas con un fluorocromo en su extremo 5' (VIC® para detectar la secuencia del alelo

1 y FAM™ para detectar la secuencia del alelo 2) y una molécula secuestradora de la fluorescencia (*quencher*) en su extremo 3'. Las sondas se unen a la secuencia diana complementaria sin emitir fluorescencia (*Förster-type energy transfer*¹⁵⁶) hasta que son escindidas por la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa. Una vez la sonda se rompe, el fluorocromo queda liberado de la actividad secuestradora del *quencher*, y la fluorescencia aumenta exponencialmente con el transcurso de los ciclos de PCR (véase la Figura 8).

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos (MicroAmp™ *Optical 384-Well reaction plate* cubiertas con MicroAmp™ *Optical adhesive film*) en los que se incluían entre 10-20 ng de DNA genómico, ensayo

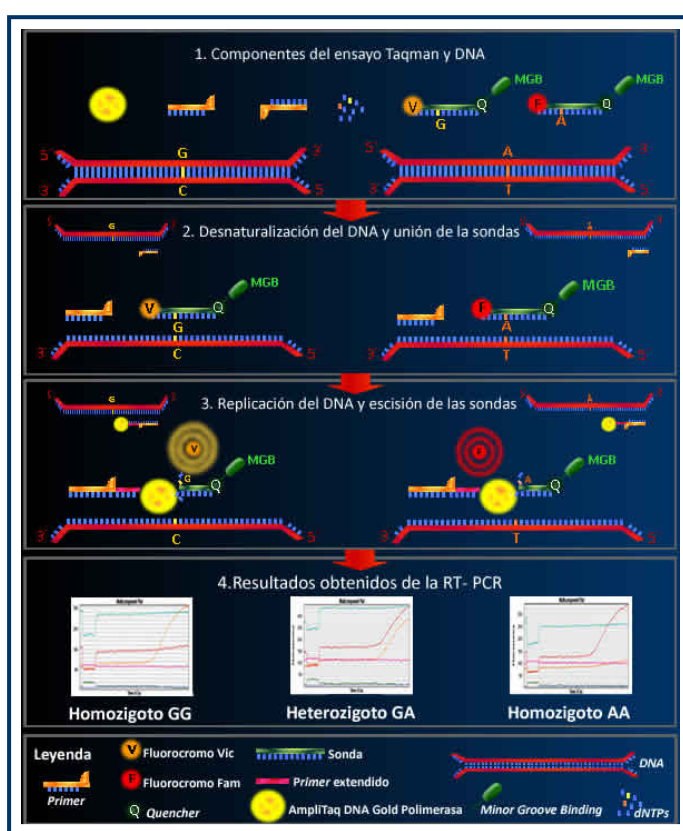


Figura 8: Genotipado de SNPs mediante tecnología TaqMan.

genotípico TaqMan (20x ó 40x) y *TaqMan Universal PCR Master Mix* con amperasa. La amperasa es un enzima Uracil-N-glicosilasa que actúa sobre DNA de una sola o doble cadena e hidroliza las uniones uracil glicosílicas. Se utiliza para prevenir la amplificación de DNA que haya sido amplificado previamente, pues el producto amplificado presenta uracilos en lugar de timinas. La RT-PCR seguía el siguiente programa: i) activación de la amperasa (50°C; 2 minutos); ii) desnaturalización del DNA (95°C; 10 minutos); iii) cuarenta ciclos de replicación que consistían en fases de desnaturalización (95°C; 15 segundos) seguidas de fases de hibridación y extensión (60°C; 1 minuto). Después de cada PCR se llevaba a cabo una lectura a tiempo final

con el programa SDS v2.2.1 que permite realizar análisis de *clusters* para establecer el genotipo de cada muestra.

1.8.2. Microsatélites

El análisis de microsatélites se realizó por amplificación de la región en estudio (PCR) seguida de una electroforesis capilar (ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer) (véase la Figura 9). Los *primers* (Metabion International AG, Martinsried, Deutschland) permiten amplificar la región en estudio y marcan los

amplificados con fluorescencia gracias a la presencia del fluorocromo FAM en el extremo 5' del *primer forward*. Posteriormente el producto de PCR se desnaturaliza y se lleva a cabo una electroforesis en capilar. La migración del DNA a través de los capilares se produce por diferencia de carga (el DNA cargado de forma negativa se dirige hacia el electrodo positivo a través del polímero 3100 POP-4™) y su llegada al cátodo es detectada por la emisión de fluorescencia del fluorocromo que porta, al ser excitado por un láser. Debido a que cada alelo del microsatélite tiene una longitud distinta, la migración de los fragmentos más ligeros (de menor longitud y mayor movilidad) será más rápida que

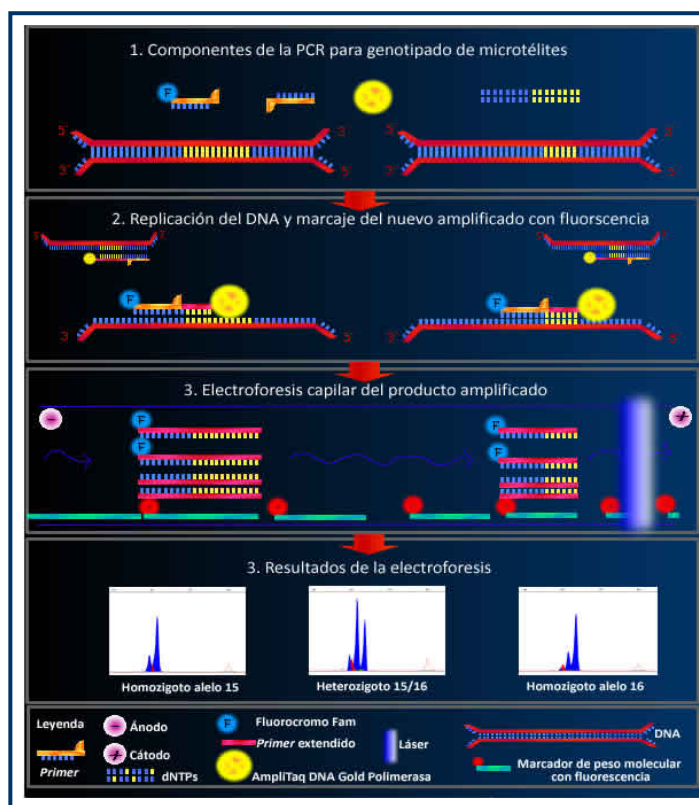


Figura 9: Genotipado de microsatélites.

la de los fragmentos más largos. La inclusión de un marcador de peso molecular (GENESCAN® 400HD ROX Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) permite finalmente establecer el tamaño del fragmento. El software 3100 Genetic Analyzer Data Collection v2.0 (Applied Biosystems) recoge los datos de la electroforesis convirtiendo la señal de fluorescencia en un dato digital, y los almacena. El software GeneMapper® v3.7 (Applied Biosystems) identifica y filtra los posibles artefactos (como picos de fluorescencia que preceden al alelo, o cadenas de poliA), para facilitar la lectura de los resultados.

1.8.3. Epítipo Compartido

El genotipado de *HLA-DRB1* de muestras para detectar la presencia del EC en pacientes de AR fue realizado con tecnología Luminex (*Lifecodes HLA-DRB Typing Kit (Tepnel Diagnostics Ltd., Abingdon, Oxon, UK)*).

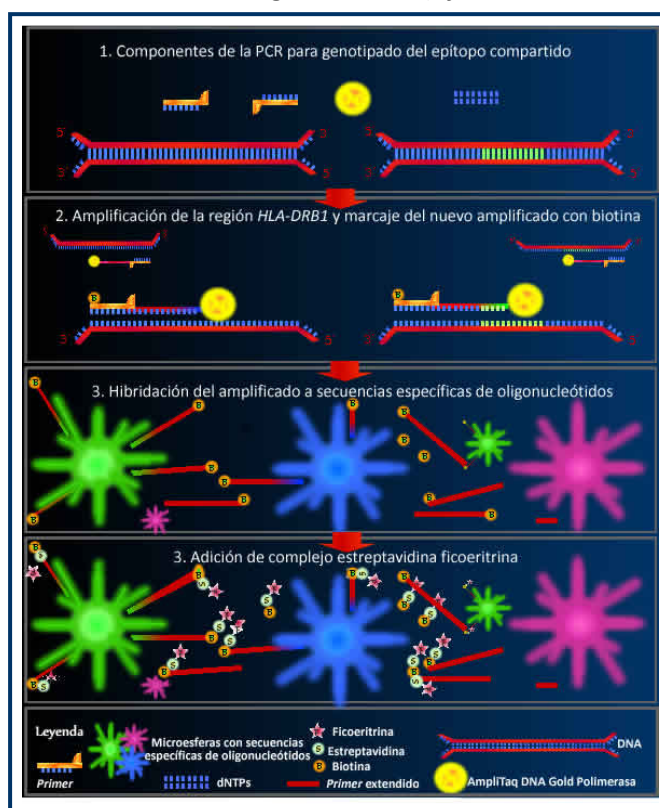


Figura 10: Tipaje del epítipo compartido.

Esta técnica consta de diversas fases secuenciales: amplificación de la región *DRB1* e hibridación del amplificado de una sola cadena a secuencias específicas de oligonucleótidos (véase la Figura 10). Estas secuencias específicas se encuentran unidas a microesferas, existiendo alrededor de unas 100 poblaciones distintas de esferas con una emisión de fluorescencia característica. El amplificado de PCR queda marcado con biotina durante la replicación de la región y posteriormente se hibrida a las microesferas correspondientes. Por último se añade un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina que se une a la biotina del DNA. De esta forma es posible detectar, discriminar y cuantificar las poblaciones de microesferas que han sido

hibridadas, y determinar la presencia del EC en cada individuo. Los alelos *HLA-DRB1* que se consideran portadores del EC son *HLA-DRB1**0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408 y *1001.

1.9. Análisis de los resultados

1.9.1. Comprobación de la calidad del genotipado

Hemos utilizado dos aproximaciones distintas a lo largo de nuestros estudios para detectar posibles errores de genotipado: repetición del genotipado y análisis de la desviación de las proporciones esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE o *Hardy-Weinberg equilibrium*). Analizamos por segunda vez un 5-10% de las muestras, tratando de establecer la calidad del genotipado. El análisis de la desviación de las proporciones esperadas bajo el HWE fue llevado a cabo en el grupo de individuos sanos en todos nuestros estudios (ver Tablas 3 y 4). Además se analizó la tasa de éxito del genotipado (nº de muestras genotipadas

con éxito/nº de muestras totales *100) con resultados superiores al 95% para todos los SNPs y microsatélites.

1.9.2. Análisis de asociación

Con el fin de detectar asociaciones de un genotipo, alelo o haplotipo con la AR realizamos estudios caso-control.

1.9.2.4. Estudios de la independencia del fenotipo frente al genotipo: las frecuencias genotípicas observadas se comparan con las frecuencias genotípicas esperadas bajo la hipótesis nula de que no existe asociación ($\chi^2 = \sum[(\text{observados}-\text{esperados})^2/\text{esperados}]$ o Test exacto de Fisher). Análisis realizado con el programa EpiInfo v6.02 (CDC, Atlanta, GA). En la sección de resultados de este trabajo de investigación sólo mostraremos los datos obtenidos de las frecuencias genotípicas cuando aporten una información relevante o el volumen de datos lo permita.

1.9.2.5. Análisis de independencia del fenotipo frente al alelo mutante: se realizó con el programa EpiInfo v6.02 (CDC, Atlanta, GA) bajo la hipótesis nula de que no existe asociación mediante un análisis χ^2 o Test exacto de Fisher. La fuerza de la asociación viene medida por la OR (*odds ratio*). Además de realizarse estudios caso-control, se han analizado las diferencias de frecuencias alélicas entre subgrupos de enfermos (presencia/ausencia de EC, anticuerpos anti-CCP, FR y sexo). Debemos advertir que la división de los pacientes en grupos no suma en todos los casos el total de individuos, puesto que no todas las determinaciones serológicas o de EC se encuentran disponibles.

1.9.2.6. Análisis de independencia del fenotipo frente a haplotipos: se realizó con el programa Statcalc bajo la hipótesis nula de que no existe asociación mediante un análisis χ^2 . El estudio de haplotipos puede presentar una mayor potencia que los estudios de SNPs aislados cuando no analicemos la variante causal o marcadores completamente equivalentes. La estimación haplotípica se llevó a cabo con el algoritmo de E-M (Expectación-Maximización), el cual asume que no existe desviación del HWE, con el programa Haploview 4.0.

1.9.3. Combinación de muestras de distintas poblaciones: test de homogeneidad y test de asociación de Mantel-Haenszel

Los estudios en los que se han combinado datos de muestras de distinto origen se han realizado con el programa EpiDat v3.1. Las pruebas de homogeneidad establecen si el comportamiento de un factor entre casos y controles difiere entre poblaciones. Para ello se comparan las ORs e intervalos de confianza (IC), calculados según el método de Woolf, para cada estrato. Si el valor de p es superior a un 10% ($p > 0,10$), se asume que no hay diferencias apreciables entre los OR en los estratos y que, por ende, los resultados ajustados pueden considerarse para el conjunto. Un resultado que indique lo contrario marcará la necesidad de presentar por separado los resultados de cada estrato. Finalmente, la prueba de asociación de Mantel-Haenszel nos ofrece los resultados combinados, y su valor de p por encima de 0,05, señala la falta de asociación.

1.9.4. Análisis de interacciones

El análisis de interacciones genéticas incluye estudios de genes candidatos y un estudio sin hipótesis previa. El análisis de genes candidatos se llevó a cabo por recuento directo, mientras que en el estudio de interacciones sin hipótesis previa se utilizó primero el programa Haploview 4.0 para detectar LD entre marcadores de *loci* no ligados. Los marcadores de genes no ligados en los que se detectó LD fueron analizados posteriormente por recuento directo.

1.9.5. Estratificación de la población

Los análisis de asociación caso-control pueden dar lugar a resultados falsos positivos si los individuos en estudio (sanos y enfermos) proceden de poblaciones distintas y las frecuencias alélicas del marcador seleccionado difieren significativamente por ello. Para combatir este problema, en primer lugar es necesario realizar una cuidadosa selección de los individuos en estudio. En nuestro caso, se comprobó que las muestras provenían de individuos españoles y con ascendencia española, preguntando su origen familiar y analizando sus apellidos.

En un intento de dilucidar si nuestra población mostraba evidencias de encontrarse estratificada, hemos analizado cinco marcadores informativos de la población europea (EuroAIMs o *European ancestry informative markers*) (rs12440216, rs12905017, rs2060983, rs1542678, rs1404402) sin que se observaran diferencias significativas entre enfermos y controles ($p_c > 0,05$ ORs entre 1,03-1,19). Además, y bajo la suposición de que las frecuencias de marcadores de poblaciones distintas difieren en *loci* a lo largo del

genoma, se obtuvo la suma de las distribuciones χ^2 de estos cinco marcadores y otros que no han sido asociados a AR (un total de 14 marcadores) y se observó que se comportaba asintóticamente ($\chi^2=1,606$; $p=0,20$).

1.9.6. Potencia del estudio

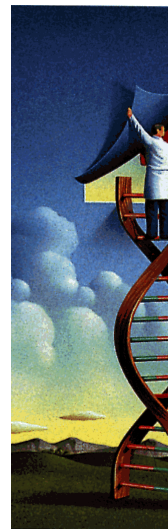
La potencia de un estudio (la capacidad de detectar de forma significativa una asociación real entre un marcador y un fenotipo) depende del tamaño de la muestra, del efecto que el marcador asociado a la enfermedad tiene en la población y de su frecuencia alélica. La potencia de cada estudio fue determinada mediante el programa EpiInfo v6.02 (CDC, *Atlanta, GA*) en base a las ORs previamente descritas.

1.9.7. Corrección estadística de los resultados

Se suele afirmar que un suceso es estadísticamente significativo cuando la probabilidad de que aparezca por azar es menor al 5%. Sin embargo, el análisis de un alto número de comparaciones resultará inevitablemente en la aparición de más sucesos improbables. Por ello es necesario realizar correcciones estadísticas atendiendo al número de comparaciones analizadas y así minimizar la descripción de resultados falsos positivos. De forma clásica y para corregir comparaciones de sucesos independientes, suele emplearse la corrección de Bonferroni, la cual establece como significativos valores de $\alpha=0,05/n^\circ$ de comparaciones analizadas. Nosotros hemos empleado esta corrección exigente cuando lo hemos considerado necesario. Sin embargo, en estudios caso-control de marcadores que se encuentran en una misma región de desequilibrio, no es fácil definir la independencia de los sucesos, por lo que esta corrección resulta extrema. Nosotros hemos optado por tratar de replicar nuestros resultados significativos en un grupo independiente de pacientes de AR y controles.

6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Los estudios genéticos en AR han sufrido una considerable evolución en los últimos años, desde los iniciales análisis de ligamiento hasta los estudios de barrido genómico libres de hipótesis. En concordancia con este continuo progreso, nuestro trabajo de investigación maneja distintas aproximaciones a lo largo del tiempo con el fin de avanzar en el conocimiento de las bases genéticas de la AR, siempre a través de estudios de asociación. En el comienzo de nuestro trabajo analizamos genes candidatos, es decir, variantes genéticas asociadas a otras enfermedades autoinmunes, a regiones de ligamiento o a regiones que por su funcionalidad, pudieran estar asociadas a la enfermedad. En un segundo estadio analizamos polimorfismos asociados a AR según los GWAS en busca de la replicación de la asociación. Por último, analizamos interacciones genéticas (descritas, candidatas, o sin hipótesis de partida) que pudieran explicar parte de la heredabilidad de la AR. Dada la complejidad de nuestros análisis y con el fin de facilitar la lectura de nuestro trabajo, mostramos cada resultado y su respectiva discusión de forma conjunta.

1.10. Análisis de genes candidatos

Los primeros análisis genéticos que realizamos en este trabajo se basaron en el estudio de genes candidatos, en los que se parte de la idea *a priori* de que el *locus* en análisis se encuentra asociado a la enfermedad. Este acercamiento ha identificado genes no-HLA ampliamente reconocidos en la susceptibilidad a AR como *PTPN22*⁶², *STAT4*¹⁰⁸, *PADI4*⁶⁴ y *CTLA4*⁶⁵. Estos *loci* además, se han asociado a diversas enfermedades autoinmunes, lo que demuestra la existencia de mecanismos patogénicos comunes en dichas enfermedades y la importancia de estudiar polimorfismos implicados en la susceptibilidad a EM, DT1, ECe, AIJ, LES, etc... en AR (Figura 11).

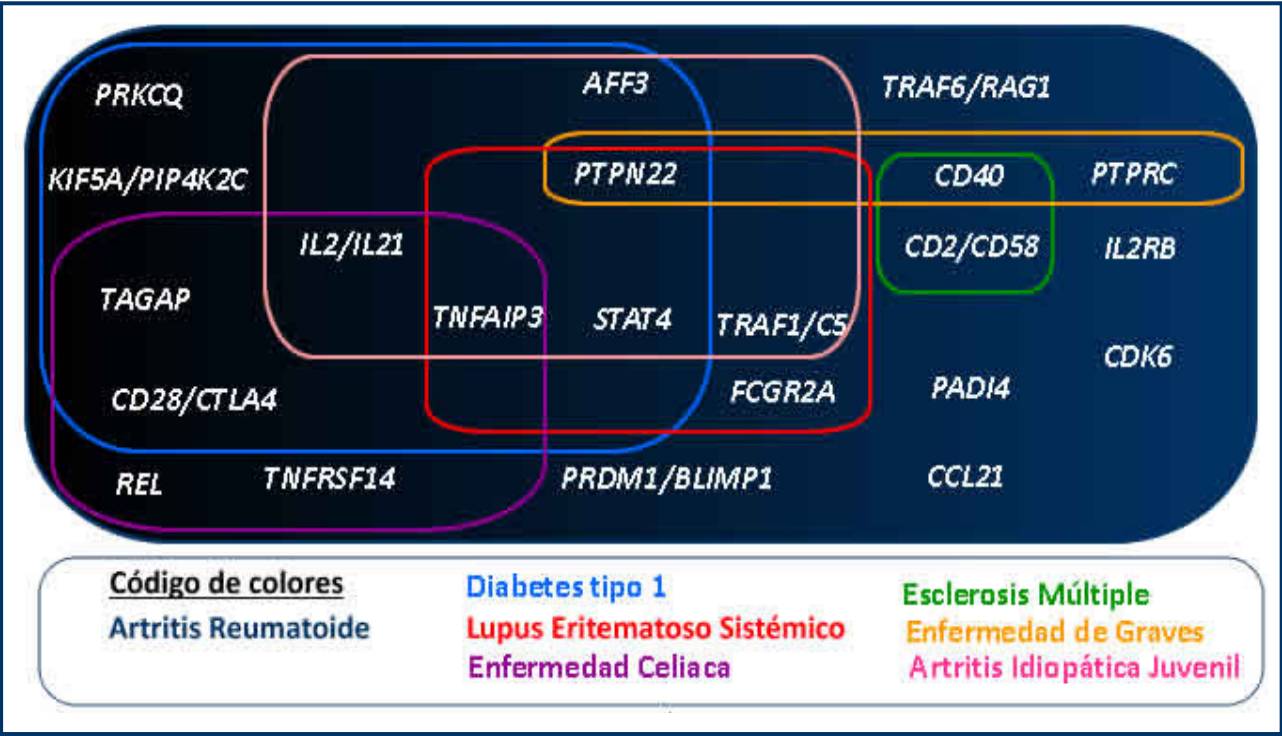


Figura 11: Factores genéticos de susceptibilidad en AR y su implicación en otras enfermedades autoinmunes.

El análisis de genes candidatos es una aproximación que sigue en uso con éxito para priorizar el análisis de los polimorfismos nominalmente significativos en los GWAS (*follow-up*) y describir y validar posibles factores genéticos implicados en la enfermedad^{93,99}. Los estudios más recientes en AR utilizan programas informáticos (como GRAIL o *gene relationships across implicated loci*) para determinar nuevos *loci* diana⁸³. Mediante el análisis de genes candidatos, hemos estudiado polimorfismos en las regiones genéticas que incluyen a los genes *CAPSL/IL7R*, *CD40*, *PTGER4* y *CIITA/CLEC16A/SOCS1*.

1.10.1. Región 5p13.2: CAPSL/IL7R

El estudio de marcadores genéticos localizados en la región *CAPSL/IL7R* en AR resulta de gran relevancia si tenemos en cuenta la función de IL7R en el proceso de supervivencia de las células linfocitarias (Figura 12) y que esta región se ha asociado previamente con otras enfermedades autoinmunes^{66,67}.

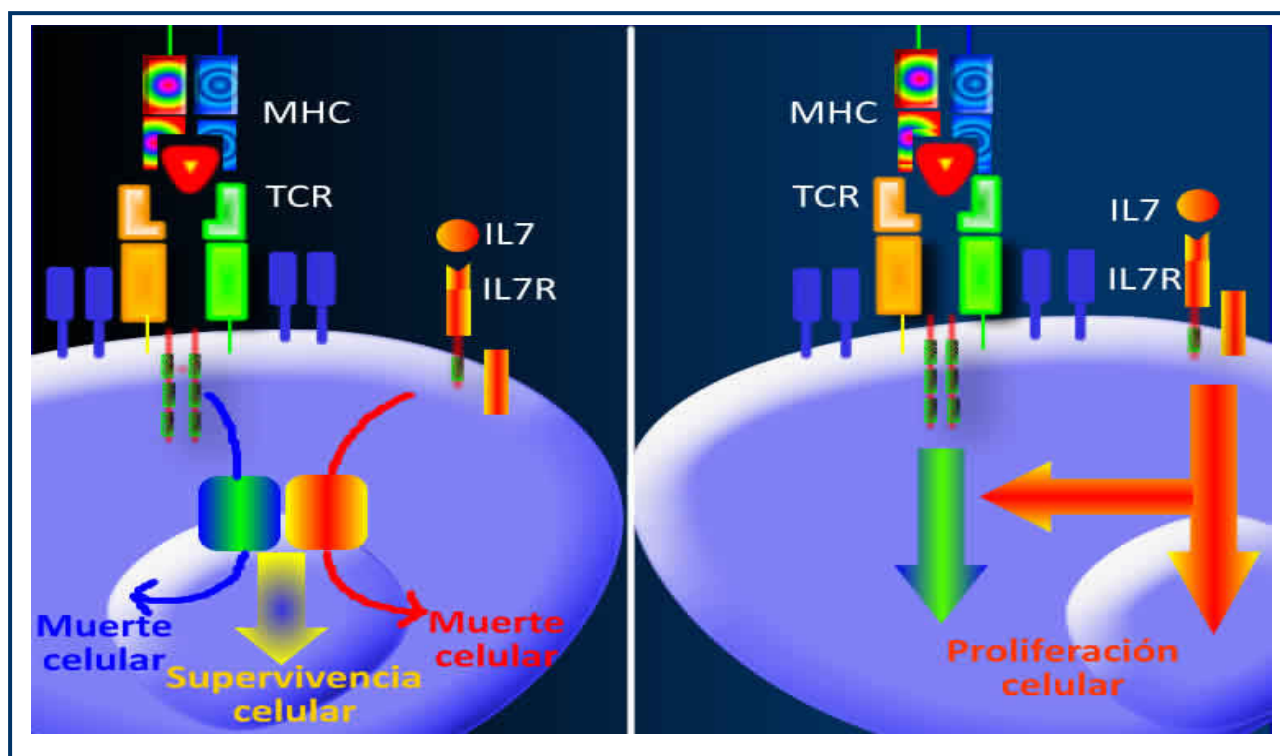


Figura 12: Señales reguladoras de la homeostasis en linfocitos de ratón. Adaptada del *National Institute of Medical Research*¹⁵⁷, muestra la implicación de IL7R en la supervivencia de las células linfocitarias.

Aunque no esperaríamos observar el bajo efecto de susceptibilidad descrito originalmente para DT1⁶⁶ (OR=0,89) en nuestras muestras de AR sin estratificar, sí consideramos posible detectar un efecto de mayor penetrancia en algún subgrupo de enfermos de AR definido por la presencia/ausencia de anticuerpos anti-CCP, FR, EC o diferentes sexos. Con este objetivo analizamos cinco marcadores en la región 5p13.1 en subgrupos de AR en población española. Nuestros resultados no muestran diferencias significativas en las frecuencias alélicas de ninguno de los marcadores analizados en esta región entre ninguno de los subgrupos de AR (ni en la totalidad de pacientes de AR y controles tal y como esperábamos) (Tabla 5).

Tabla 5: Distribución de frecuencias alélicas de los polimorfismos en la región *CAPSL/IL7R* estudiados en pacientes de AR e individuos control.

Muestra	rs6897932			rs987106			rs3194051			rs1010601			rs1445898		
	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística
	C	T	p	T	A	p	A	G	p	A	G	p	C	T	p
Controles	959	333	0,938	687	605	0,182	908	384	0,883	764	528	0,872	704	588	0,849
	(74,2%)	(25,8%)		(53,2%)	(46,8%)		(70,3%)	(29,7%)		(59,1%)	(40,9%)		(54,5%)	(45,5%)	
Casos de AR	821	283		605	477		749	321		641	449		596	490	
	(74,4%)	(25,6%)		(55,9%)	(44,1%)		(70,0%)	(30,0%)		(58,8%)	(41,2%)		(54,9%)	(45,1%)	
Anti-CCP+	405	133	0,552	297	227	0,602	354	166	0,215	304	222	0,406	283	237	0,86
	(75,3%)	(24,7%)		(56,7%)	(43,3%)		(68,1%)	(31,9%)		(57,8%)	(42,2%)		(54,4%)	(45,6%)	
Anti-CCP-	355	127		262	214		337	133		291	191		265	217	
	(73,7%)	(26,3%)		(55,0%)	(45,0%)		(71,7%)	(28,3%)		(60,4%)	(39,6%)		(55,0%)	(45,0%)	
FR+	523	185	0,448	386	298	0,547	477	215	0,483	409	291	0,783	385	309	0,836
	(73,9%)	(26,1%)		(56,4%)	(43,6%)		(68,9%)	(31,1%)		(58,4%)	(41,6%)		(55,5%)	(44,5%)	
FR-	242	76		173	145		217	85		184	126		172	142	
	(76,1%)	(23,9%)		(54,4%)	(45,6%)		(71,9%)	(28,1%)		(59,4%)	(40,6%)		(54,8%)	(45,2%)	
EC +	426	150	0,884	314	250	0,934	398	168	0,717	342	222	0,496	311	253	0,443
	(74,0%)	(26,0%)		(55,7%)	(44,3%)		(70,3%)	(29,7%)		(60,6%)	(39,4%)		(55,1%)	(44,9%)	
EC-	331	119		245	193		314	126		261	185		233	209	
	(73,6%)	(26,4%)		(55,9%)	(44,1%)		(71,4%)	(28,6%)		(58,5%)	(41,5%)		(52,7%)	(47,3%)	
Mujeres	615	195	0,049	438	358	0,325	541	243	0,24	465	337	0,354	448	350	0,165
	(75,9%)	(24,1%)		(55,0%)	(45,0%)		(69,0%)	(31,0%)		(58,0%)	(42,0%)		(56,1%)	(43,9%)	
Hombres	206	88		167	119		208	78		176	112		148	140	
	(70,1%)	(29,9%)		(58,4%)	(41,6%)		(72,7%)	(27,3%)		(61,1%)	(38,9%)		(51,4%)	(48,6%)	

Anti-CCP= anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado; FR= factor reumatoide; EC= epítipo compartido.



Nosotros decidimos analizar la implicación del SNP rs1883832 localizado en *CD40* en el desarrollo de AR en diferentes subgrupos de enfermos de AR en población española, según la presencia de factores asociados a formas severas de la enfermedad como son los anticuerpos anti-CCP, FR o EC. Esta decisión se vio favorecida por otro estudio en población española que asocia este polimorfismo a la pérdida de masa ósea en mujeres post-menopáusicas ($OR > 2$)⁶⁹, un hecho que resulta de gran relevancia en el proceso patológico de la AR. Nuestro estudio del SNP rs1883832, aunque tiene la potencia estadística suficiente para detectar un efecto de esta magnitud, no muestra diferencias genotípicas ni alélicas significativas entre los distintos subgrupos de enfermos en población española (Tabla 6).

Tabla 6: Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs1883832 en individuos control, casos totales de AR y subgrupos de AR atendiendo a la presencia/ausencia de anticuerpos anti-CCP, FR o EC.

Muestra	Subgrupo	Genotipos n (%)			Alelos n (%)		Estadística
		CC	CT	TT	C	T	
Controles		428 (54,3%)	295 (37,4%)	65 (8,3%)	1151 (73,0%)	425 (27,0%)	0,655
Casos de AR	Total	294 (53,9%)	218 (39,9%)	34 (6,2%)	806 (73,8%)	286 (26,2%)	
	Anti-CCP+	154 (57,5%)	95 (35,4%)	19 (7,1%)	403 (75,2%)	133 (24,8%)	0,214
	Anti-CCP-	117 (49,4%)	106 (44,7%)	14 (5,9%)	340 (71,7%)	134 (28,3%)	
	FR+	187 (53,3%)	143 (40,7%)	21 (6,0%)	517 (73,6%)	185 (26,4%)	0,855
	FR-	84 (54,2%)	62 (40,0%)	9 (5,8%)	230 (74,2%)	80 (25,8%)	
	EC+	147 (51,2%)	124 (43,2%)	16 (5,6%)	418 (72,8%)	156 (27,2%)	0,682
	EC-	122 (55,7%)	80 (36,5%)	17 (7,8%)	324 (74,0%)	114 (26,0%)	

Anti-CCP= anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado; FR= factor reumatoide; EC= epítipo compartido.

Recientemente, un meta-análisis de GWAS con replicación en muestras independientes ha mostrado evidencias de asociación del marcador rs4810485 en la región de *CD40*³⁸ a AR (relación con rs1883832 de $D' = 1$ y $r^2 = 0,95$), por lo que, actualmente, la importancia de esta vía de señalización en esta enfermedad se encuentra validada. El efecto promedio de este SNP en AR es de $OR = 0,88$, lo que exige un gran número de individuos para su detección. Nuestro estudio carece por tanto de la potencia necesaria para observar el efecto descrito. Este efecto podría ser mayor en algún subgrupo de pacientes no considerado en este trabajo, aunque no se ha publicado ningún artículo al respecto. Se cree que la asociación de este polimorfismo a la AR podría explicarse por su alta correlación con el marcador aquí estudiado, el rs1883832, el cual podría alterar la traducción de *CD40* al afectar a la secuencia Kozak¹⁶¹ (una secuencia que

precede al codon de iniciación de la molécula de RNAm que que juega un papel importante en el inicio de la traducción y que es reconocida por el ribosoma). Esta misma región se ha asociado a otras enfermedades autoinmunes, como la EG¹²⁷ y la EM¹²⁶.

1.10.3. Región 5p13.1: *PTGER4*

La región 5p13.1 se ha asociado recientemente a la ECr⁷⁰ y se ha demostrado que a pesar de encontrarse en un desierto génico contiene elementos reguladores del gen *PTGER4* que codifica el receptor de la PGE₂. La unión de la PGE₂ a sus receptores tiene gran importancia en la patología de la CIA⁷¹ (Figura 14) y los análisis del WTCCC¹⁵⁸ muestran una asociación nominal de esta región 5p13.1 a AR.

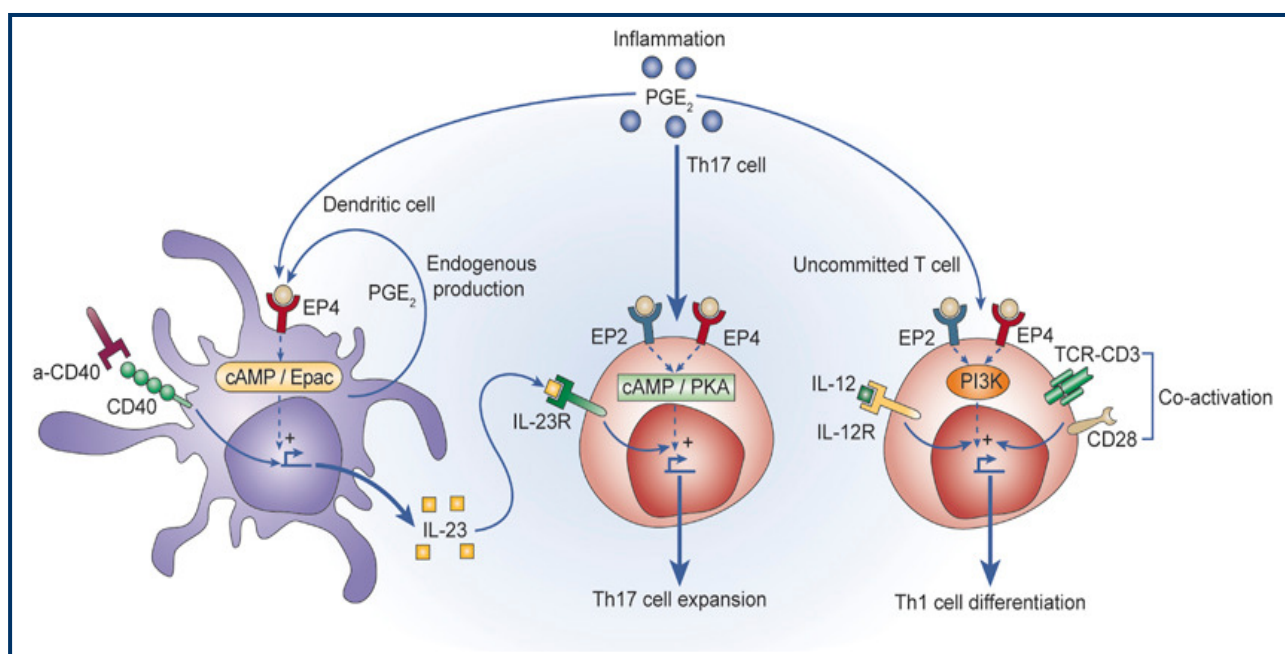


Figura 14: La unión de PGE₂ a sus receptores (EP) influye en la diferenciación y función efectora de las células dendríticas y Th.

La activación de EP4 en la célula dendrítica contribuye a la producción y liberación de IL-23 si se produce además la activación de CD40. La IL-23 induce la expansión de células Th17 con la ayuda de la unión de PGE₂ a los receptores EP2 y EP4. La activación de EP2 y EP4 facilita la diferenciación hacia Th1 inducida por IL-12. Figura obtenida de Chizzolini & Brembilla, 2009¹⁶².

El posible efecto de susceptibilidad de esta región descrito en esta base de datos anglosajona en AR es muy bajo ($rs6871834$ OR=0,88)¹⁵⁸, por lo que un análisis en nuestro conjunto de pacientes españoles de AR no podría detectarlo. Con el fin de identificar al subgrupo de enfermos donde esta región pudiera ejercer un fuerte efecto en el desarrollo de la enfermedad, analizamos los polimorfismos: rs17234657, rs6896969 (asociados a enfermedad de Crohn) y rs6871834, en subgrupos de AR caracterizados por la presencia/ausencia de anticuerpos anti-CCP, FR, EC o diferencias en sexo. No se observaron diferencias

significativas en las distribuciones alélicas de estos polimorfismos en la región 5p13.1 entre los subgrupos de pacientes de AR (Tabla 7). El estudio de haplotipos no aportó ninguna información adicional.

Tabla 7: Distribución alélica de los polimorfismos de la región *PTGER4* en estudio en individuos control, el total de casos de AR y subgrupos de AR.

Muestra	rs17234657			rs6896969			rs6871834		
	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística
	T	G	p	C	A	p	A	G	p
Controles	1388 (88,3%)	184 (11,7%)	0,612	950 (62,3%)	574 (37,7%)	0,096	1011 (64,6%)	555 (35,4%)	0,365
Casos de AR	980 (88,9%)	122 (11,1%)		666 (59,1%)	460 (40,1%)		723 (62,9%)	427 (37,1%)	
Anti-CCP+	486 (90,3%)	52 (9,7%)	0,421	332 (58,0%)	240 (42,0%)	0,507	350 (61,0%)	224 (39,0%)	0,239
Anti-CCP-	428 (88,8%)	54 (11,2%)		299 (60,0%)	199 (40,0%)		321 (64,5%)	177 (35,5%)	
FR+	633 (89,9%)	71 (10,1%)	0,654	408 (58,0%)	296 (42,0%)	0,949	433 (62,0%)	265 (38,0%)	0,863
FR-	283 (89,0%)	35 (11,0%)		179 (57,7%)	131 (42,3%)		193 (61,5%)	121 (38,5%)	
EC +	509 (89,0%)	63 (11,0%)	0,379	357 (60,7%)	231 (39,3%)	0,131	371 (62,2%)	225 (37,8%)	0,555
EC-	408 (90,7%)	42 (9,3%)		258 (56,1%)	202 (43,9%)		297 (64,0%)	167 (36,0%)	
Mujeres	723 (88,8%)	91 (11,2%)	0,846	498 (59,6%)	338 (40,4%)	0,624	536 (63,2%)	312 (36,8%)	0,456
Hombres	257 (89,2%)	31 (10,8%)		168 (57,9%)	122 (42,1%)		187 (61,9%)	115 (38,1%)	

Anti-CCP= anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado; FR= factor reumatoide; EC= epítipo compartido.

Los estudios de meta-análisis de GWAS más recientes tampoco muestran asociación significativa de esta región con AR, por lo que la asociación nominal de un marcador observada en el WTCCC podría no indicar una verdadera asociación. Aún así, debemos tener en cuenta que, ni nuestro estudio ni el realizado por el WTCCC⁹², recoge toda la variabilidad existente en esta región genómica, por lo que no podemos descartar que este *locus* se encuentre asociado a AR o a algún subgrupo de la enfermedad.

1.10.4. Región 16p13: *CIITA/CLEC16A/SOCS1*

Recientemente se han asociado polimorfismos en la región 16p13 que contiene el gen *CLEC16A* a DT1⁷⁷ y EM⁶⁷. El análisis de este *locus* por el WTCCC no detecta asociación en AR, aunque el estudio no recoge toda la variabilidad de la zona. En esta misma región 16p13 se localiza otro gen candidato, *CIITA*, que se ha asociado a AR en población sueca⁷⁵ y en población española⁷⁶ (el trabajo fue publicado por nuestro grupo de investigación), aunque tampoco muestra evidencias de asociación en el estudio del WTCCC. La asociación que describió nuestro grupo de investigación no implicaba a un único polimorfismo sino a un haplotipo conformado por *CIITA* rs3087456G/rs4774C, lo que explicaría que el efecto no fuera detectado por el WTCCC. El único indicio que implica a la región 16p13 en este estudio anglosajón de barrido genómico es una asociación nominal en un bloque de desequilibrio adyacente a *CLEC16A* que incluye al *locus* *SOCS1*. Dado que el papel de la región 16p13 en AR parece controvertido, y contiene interesantes genes candidatos (Figura 15), decidimos analizar polimorfismos en *CLEC16A/SOCS1* en pacientes de AR y subgrupos de éstos en población española.

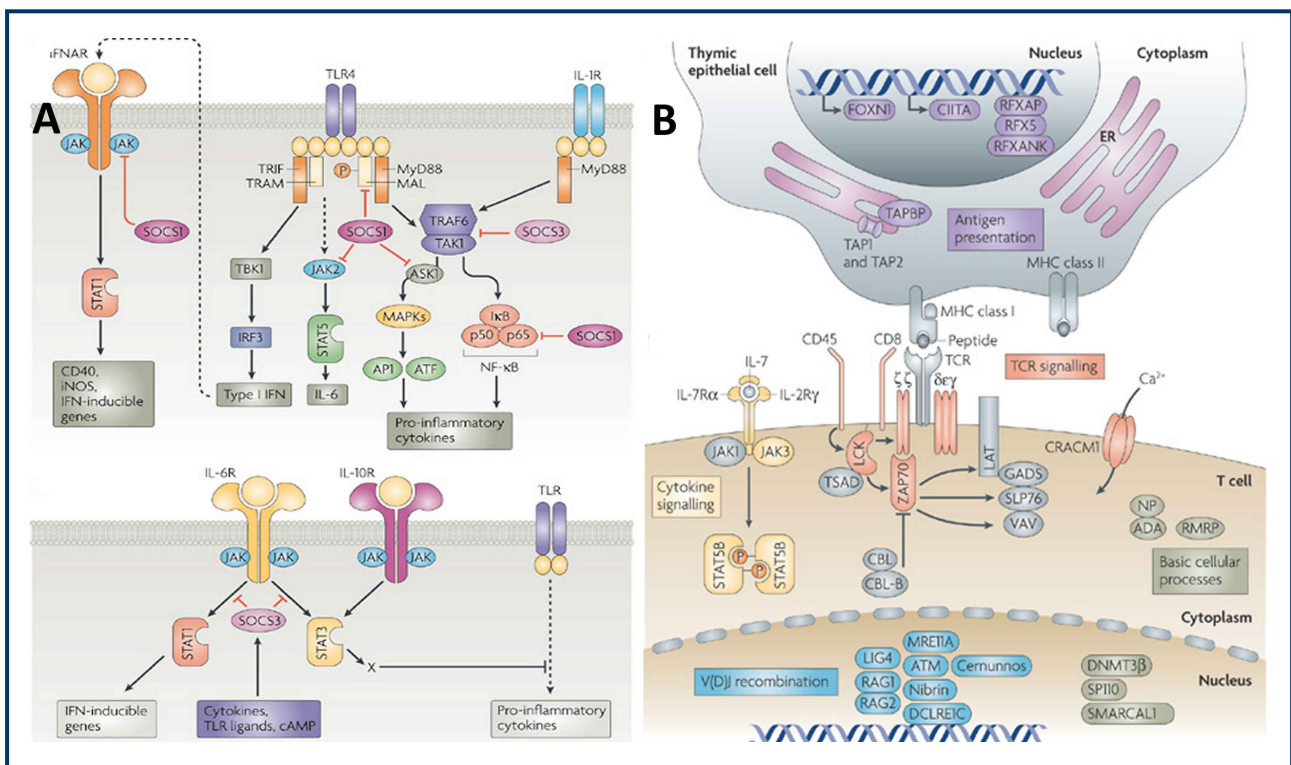


Figura 15: Implicación de las proteínas SOCS1 (A) y CIITA (B) en la respuesta inmune. La figura A se ha obtenido de Yoshimura *et al.*, 2007¹⁶³; la figura B se ha obtenido de Liston *et al.*, 2008¹⁶⁴.

La Tabla 8 muestra las frecuencias alélicas de los tres polimorfismos en estudio en la región *CLEC16A/SOCS1*: rs2903692, rs6498169 y rs11074956. Se observaron diferencias significativas en la distribución alélica del polimorfismo rs6498169 (*CLEC16A*) entre el total de enfermos de AR y controles. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas tras la estratificación por presencia/ausencia de EC, anticuerpos anti-CCP, FR o sexo (Tabla 8)

Tabla 8: Distribución alélica de los polimorfismos de la región *CLEC16A/SOCS1* en estudio en individuos control, el total de casos de AR, y subgrupos de enfermos.

Muestra	rs2903692			rs64981689			rs11074956			
	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística	
	G	A		A	G		G	T		
Controles	621 (58,4%)	443 (41,6%)	0,057	742 (67,8%)	352 (32,2%)	0,008	1,27 (1,06- 1,51)	654 (60,6%)	426 (39,4%)	0,699
Casos de AR	740 (62,3%)	448 (37,7%)		712 (62,5%)	428 (37,5%)			686 (61,4%)	432 (38,6%)	
Anti-CCP+	320 (62,7%)	190 (37,3%)	0,284	311 (63,2%)	181 (36,8%)	0,877		306 (59,8%)	206 (40,2%)	0,586
Anti-CCP+	189 (66,5%)	95 (33,5%)		293 (63,7%)	167 (36,3%)			284 (61,5%)	178 (38,5%)	
FR+	446 (62,1%)	272 (37,9%)	0,504	430 (62,3%)	260 (37,7%)	0,389		404 (59,8%)	272 (40,2%)	0,248
FR-	193 (59,9%)	129 (40,1%)		202 (65,2%)	108 (34,8%)			196 (63,6%)	112 (36,4%)	
EC +	390 (63,9%)	220 (36,1%)	0,208	350 (59,9%)	234 (40,1%)	0,091		355 (62,5%)	213 (37,5%)	0,138
EC-	278 (60,2 %)	184 (39,8%)		289 (65,1%)	155 (34,9%)			237 (57,8%)	173 (42,2%)	
Mujeres	548 (62,3%)	331 (37,7%)	0,713	530 (62,8%)	314 (37,3%)	0,989		496 (60,0%)	331 (40,0%)	0,235
Hombres	189 (61,2%)	120 (38,8%)		186 (62,8%)	110 (37,2%)			186 (63,9%)	105 (36,1%)	

Anti-CCP= anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado; FR= factor reumatoide; EC= epítipo compartido.

También nos propusimos replicar el efecto de susceptibilidad del haplotipo rs3087456G/rs4774C observado en un trabajo previo en nuestra población⁷⁶. Para ello analizamos un conjunto de muestras independientes de AR y de controles procedentes de alelos no transmitidos de parentales sanos de individuos con enfermedad celiaca (Tabla 9). El análisis de estas nuevas muestras confirmó los datos anteriores ($p=0,014$; OR (95% IC)=1,93 (1,1-3,41)).

Tabla 9: Distribución haplotípica de *CIITA* (GC) y de *CLEC16A* (AA) y de los alelos que lo conforman en el estudio caso-control de replicación.

Muestra	<i>CIITA</i>			<i>CLEC16A</i>		
	Haplotipo GC	rs3087456 G	rs4774 C	Haplotipo AA	rs2903692 A	rs6498169 A
Controles	23 (5,08%)	116 (25,21%)	110 (24,22%)	184 (27,7%)	187 (38,79%)	159 (33,40%)
Casos de AR	39 (9,37%)	126 (28,89%)	126 (28,25%)	147 (33,25%)	156 (33,91%)	178 (39,55%)

Finalmente, el análisis de la población control española muestra la existencia de LD entre los *loci* *CIITA* y *CLEC16A* en la región 16p13. Así, observamos que el haplotipo de *CLEC16A* definido por rs2903692A/rs6498169A se encuentra en LD con el haplotipo de susceptibilidad a la AR (rs3087456G/rs4774C de *CIITA*) descrito en nuestra población (la presencia del haplotipo de susceptibilidad GC para el *CIITA* en el haplotipo AA de *CLEC16A* es del 2% (8 de 409), mientras que la presencia del haplotipo GC de *CIITA* en el resto de los pacientes es de un 7% (39 de 556; $p=0,0008$)).

Nuestros datos muestran nuevas evidencias de que la región 16p13 se encuentra implicada en el desarrollo de la AR en población española, aunque esta asociación no se ha observado ni en los estudios GWAS ni en sus respectivos meta-análisis. Un caso similar ocurre con un polimorfismo asociado a AR por un GWAS en población española en el gen *KLF12*¹³², que no ha sido replicado en población inglesa¹⁶⁵. Una razón por la que se hubieran podido obtener estos resultados sería por azar, y que la asociación encontrada fuera un falso positivo. A favor de esta suposición se encuentra el hecho de que el hallazgo observado en *CLEC16A* en población española no soporta la corrección de Bonferroni. Sin embargo, nuestro estudio no sólo muestra nuevas evidencias de asociación de la región 16p13 a AR al detectar una posible señal en *CLEC16A*, sino que fundamentalmente replica en un conjunto de muestras independiente el efecto de susceptibilidad previamente descrito del haplotipo GC definido por los polimorfismos rs3087456 y rs4774 de *CIITA*. Nuestros datos indican que aunque las regiones *CIITA* y *CLEC16A/SOCS1* se encuentran separadas

por más de más de 270 kb, existe desequilibrio de ligamiento entre ellas en nuestra población control (definido por el LD entre los haplotipos conformados por rs3087456G/rs4774C y rs2903692A/rs6498169A). Si la asociación en la región 16p13 encontrada es cierta, como proponemos, la falta de asociación en otras poblaciones podría explicarse: por diferencias de LD con el factor etiológico, porque los estudios publicados no analizan haplotipos de esta zona sino polimorfismos aislados que no son el agente causal ni están en fuerte LD con él o porque el efecto de estos marcadores sobre AR en dichas poblaciones es menor que en población española. En este caso, las interacciones genéticas o genético-ambientales serían factores que estarían influyendo con gran fuerza en la detección de la asociación. Nuestro estudio muestra nuevas evidencias de que la región 16p13 podría estar implicada en la susceptibilidad a la AR en población española, aunque no podemos determinar si las señales detectadas son independientes entre sí o marcan a un mismo agente causal.

1.11. Replicación de Estudios GWAS

Los estudios de barrido genómico han tenido un gran éxito en la descripción de factores genéticos de susceptibilidad en AR y la replicación de sus resultados es imprescindible en la validación de las asociaciones. Los análisis de barrido genómico no están exentos del peligro de cometer errores de tipo I y diferencias de LD pueden alterar los resultados entre poblaciones, pues no debemos olvidar que, los marcadores asociados no suelen ser el factor etiológico. Así pues, decidimos replicar en población española la asociación de las regiones *TRAF1/C5* en 9q33 y *OLIG3/TNFAIP3* en 6q23 descritas en población caucásica por análisis GWAS (el papel de las proteínas codificadas por los genes presentes en estas regiones asociadas a AR se muestran en la Figura 16).

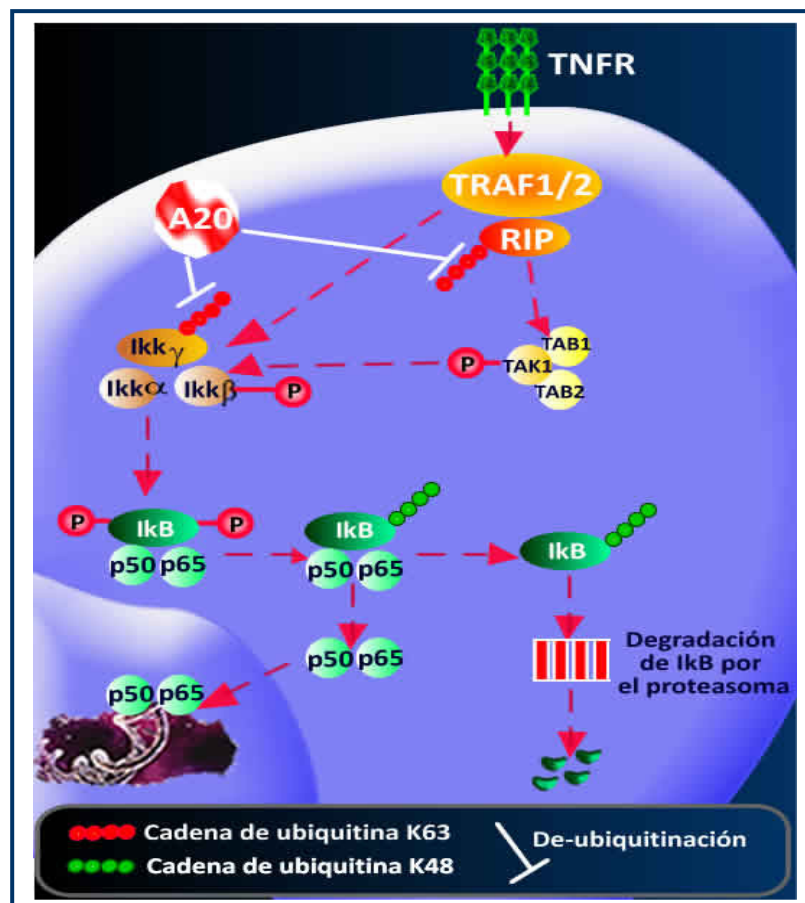


Figura 16: Vía de activación del TNF. En esta vía se encuentran implicadas las proteínas codificadas por dos *loci* asociados a AR en estudios GWAS: TRAF1 (codificada en la región 9q33) y A20 (codificada en la región 6q23).

1.11.1. Región 9q33: *TRAF1/C5*

La región 9q33, que incluye los genes *TRAF1/C5*, se ha asociado a susceptibilidad a la AR gracias a un GWAS¹²¹ y a un estudio independiente de genes candidatos⁸⁰, publicados ambos en 2007. El gen *TRAF1* codifica una proteína que media la transducción de señales de TNFR 1 y 2, así como de CD40. Si tenemos en cuenta que la citoquina TNF es clave en la patogénesis de la AR por su efecto inflamatorio y que las moléculas antagonistas son utilizadas en la terapia contra AR de forma muy efectiva¹⁶⁶, es fácil implicar funcionalmente este *locus* a la enfermedad. Dado que los ratones *knock-out* para *TRAF1* sufren una proliferación exagerada de células T en respuesta a la activación por TNF o TCR¹⁶⁷, se hipotetiza que TRAF1 actuaría como un regulador negativo en estas vías. Además TRAF1 se une a varias proteínas intracelulares, entre las que se incluye TNFAIP3 (más conocido como A20), que también ha sido asociado a AR y veremos más adelante. El otro *locus* candidato en esta región, el gen *C5*, codifica una proteína del complemento. La escisión de esta proteína genera dos péptidos, C5a, con una potente actividad inflamatoria, y C5b, que forma parte del complejo de ataque de membrana¹⁶⁸.

La región 9q33 también se ha asociado a otras enfermedades autoinmunes como la AIJ¹²² y el LES¹²³; se cree que la asociación de las variantes genéticas en estas enfermedades se debe a su alto desequilibrio de ligamiento con la variante etiológica. Aunque varios estudios apuntan a que la señal no se encuentra en la región codificante de *C5*, es posible que la variante etiológica esté implicada en la regulación de la activación de este gen⁸⁰.

Nuestro estudio analiza cuatro polimorfismos en la región 9q33: rs2269059, rs13440146, rs2416806 y rs3761847. La Tabla 10 muestra la distribución de frecuencias alélicas de cada uno de estos SNPs en pacientes de AR y controles, sin que se observen diferencias significativas entre ellos. Dado que la mayoría de estudios analizan exclusivamente pacientes de AR que presentan anticuerpos anti-CCP, decidimos analizar nuevamente la diferencia en la distribución de frecuencias alélicas entre pacientes con serología positiva (anticuerpos anti-CCP y FR) y controles. No se observaron diferencias significativas ellos (Tabla 10) y las distribuciones haplotípicas tampoco añadieron información adicional.

Tabla 10: Distribución de frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados en la región *TRAF1/C5* en controles, en el conjunto de casos de AR y en subgrupos de AR.

Muestra	rs13440146			rs2269059			rs3761847			rs2416806		
	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística	Alelos n (%)		Estadística
	G	T	p	T	A	p	A	G	p	C	G	p
Controles	1015 (93,6%)	69 (6,4%)	0,973	1007 (92,9%)	77 (7,1%)	0,575	671 (63,8%)	381 (36,2%)	0,869	761 (70,3%)	321 (29,7%)	0,814
Casos de AR	1009 (93,6%)	69 (6,4%)		1002 (92,3%)	84 (7,7%)		675 (63,4%)	389 (36,6%)		766 (70,8%)	316 (29,2%)	
Anti-CCP+	496 (94,7%)	28 (5,3%)	0,174	488 (92,4%)	40 (7,6%)	0,458	330 (63,6%)	189 (36,4%)	0,654	378 (71,6%)	150 (28,4%)	0,485
Anti-CCP-	435 (92,6%)	35 (7,4%)		432 (91,1%)	42 (8,9%)		298 (62,2%)	181 (37,8%)		327 (69,6%)	143 (30,4%)	
FR+	645 (94,6%)	37 (5,4%)	0,124	636 (92,2%)	54 (7,8%)	0,782	442 (64,1%)	247 (35,9%)	0,826	487 (71,0%)	199 (29,0%)	0,688
FR-	289 (92,0%)	25 (8,0%)		291 (92,7%)	23 (7,3%)		196 (63,4%)	113 (36,6%)		219 (69,7%)	95 (30,3%)	

Anti-CCP= anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado; FR= factor reumatoide.

Nuestro trabajo, por lo tanto, no detecta asociación de la región 9q33 a AR ni a ningún subgrupo serológico de ésta en población española, a pesar de que la potencia inicial de nuestro estudio para detectar el efecto del polimorfismo rs3761847 originalmente descrito ($OR=1,32$)¹²¹ era de un 86%. Los trabajos posteriores de replicación indican que el efecto del rs3761847 y de otros SNPs estudiados en la zona (rs10818488, $r^2=96\%$) no es tan fuerte como el que se describió por primera vez ($OR\approx 1,10$)¹⁶⁹. Los estudios que describen nuevas asociaciones de un marcador a una enfermedad suelen padecer la secuela del fenómeno conocido como “*winner’s curse*”, en el que el efecto del marcador se encuentra sobreestimado. En un análisis más profundo, no creemos que el “*winner’s curse*” sea el único factor responsable de la enorme variación observada, sino que la variabilidad de los resultados puede ser explicada por las diferencias existentes entre las poblaciones norteamericanas y europeas. El primer artículo publicado del SNP rs3761847 analiza muestras NARAC (*North American Rheumatoid Arthritis Consortium*) y EIRA (*Swedish Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis*). El efecto de este polimorfismo en ambas poblaciones difiere de forma significativa de acuerdo con el test de homogeneidad ($p=0,023$). Este mismo test indica que no existen diferencias en el efecto del SNP entre las poblaciones europeas EIRA, WTCCC y HCSC ($p=0,257$), pudiendo ser combinadas en un único estudio que permite observar asociación del polimorfismo con la enfermedad ($OR_{MH}=1,10$ (1,04-1,16); $p=0,004$), aunque el efecto es significativamente menor que en población norteamericana (test de homogeneidad $p<0,001$; $OR_{NARAC}=1,41$ (1,29-1,55); véase la Figura 17). Las diferencias de penetrancia de este marcador entre poblaciones europea y norteamericana podrían ser explicadas por diferencias genéticas o ambientales o por la diferencia de LD del marcador con el factor etiológico.

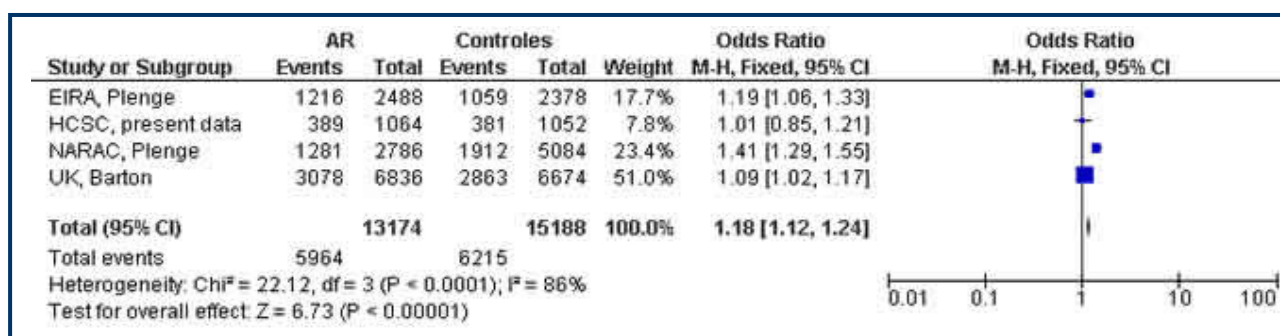


Figura 17: Estudio del polimorfismo rs3761847 en AR en distintas poblaciones. Véase que el efecto de susceptibilidad en población norteamericana (NARAC) es significativamente mayor que en población europea.

1.11.2. Región 6q23: *OLIG3/TNFAIP3*

La región 6q23 también se ha asociado a AR en población caucásica a través de estudios GWAS^{81,82}. Los polimorfismos asociados (rs10499194 y rs6920220 con $D'=1$ y $r^2=0,11$) se encuentran en un desierto intergénico que no codifica ninguna secuencia proteica. Se postula que la asociación podría deberse a que ambos polimorfismos conformen un haplotipo que marca la variante causal o a que las variantes en estudio presenten un r^2 muy alto con otras variantes en zonas reguladoras que sí jugarían un papel importante sobre la activación de genes adyacentes. En este sentido, los genes más cercanos son *TNFAIP3* (*tumor necrosis factor alpha induced protein 3*) y *OLIG3* (*oligodendrocyte transcription factor 3*). Puesto que los ratones mutantes en *Olig3* padecen alteraciones en el desarrollo neuronal¹⁷⁰, y los ratones mutantes en *Tnfaip3* padecen inflamación crónica¹⁷¹, se postula que este último gen es un buen candidato para explicar la asociación con AR. *TNFAIP3* codifica una de-ubiquitinasa (conocida como A20) cuya función es la de inhibir la señalización de NF- κ B. Ya que NF- κ B es un factor de transcripción esencial en los procesos inflamatorios y los pacientes de AR tienen muy aumentados los niveles de TNF, se cree que las mutaciones en *TNFAIP3* alterarían la ruta de inhibición de la activación de NF- κ B.

En los estudios GWAS, los polimorfismos analizados han sido estrictamente definidos como marcadores de susceptibilidad en AR con serología positiva a anticuerpos anti-CCP y/o FR^{81,82}. Si bien es cierto que existen pocos estudios que incluyan pacientes de AR con serología negativa, uno de ellos demuestra diferencias significativas en la distribución del rs6920220 entre pacientes de AR con y sin anticuerpos anti-CCP⁸². Podría tratarse, por lo tanto, de una región genética no-*HLA* de susceptibilidad asociada a un subgrupo de enfermos de AR, añadiendo así nuevas evidencias de que la AR no es una única enfermedad. El objetivo de nuestro estudio fue validar la asociación de ambos polimorfismos localizados en 6q23 a AR con serología positiva (anti-CCP y FR) en población española. La correlación entre ambos anticuerpos en nuestro grupo de pacientes era muy alta, tal y como se había descrito ($p=0,001$). En la Tabla 11 observamos que la frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs6920220 es significativamente mayor en los pacientes portadores de anticuerpos anti-CCP o FR que en los individuos control ($p=0,014$ y $p=0,015$, respectivamente). Así pues, se replica el efecto del marcador rs6920220 en pacientes de AR españoles con serología positiva, no siendo necesarias correcciones estadísticas. Debemos recalcar que encontramos diferencias significativas entre pacientes de AR con FR positivo y negativo y que el efecto de susceptibilidad se restringe al grupo de enfermos con FR positivo (test de homogeneidad del efecto entre pacientes FR positivos y controles vs. pacientes FR negativos y controles de $p=0,028$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre individuos anti-CCP positivos y negativos, quizás debido a una falta de potencia de nuestro estudio.

Nuestros resultados no muestran, sin embargo, asociación entre el marcador rs10499194 y AR, ni siquiera tras realizar la estratificación serológica (Tabla 11). Las distribuciones haplotípicas no proporcionaron información adicional.

Tabla 11: Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs10499194 y rs6920220 en individuos control, en el total de casos de AR y en el subconjunto de enfermos de AR según presencia/ausencia de anticuerpos anti-CCP, FR y de las variantes de susceptibilidad de EC y *PTPN22 1858T*.

SNP	Muestra	Subgrupo	Genotipos n (%)			Alelos n (%)		Positivo vs. Negativo		Pacientes vs. Controles	
rs10499194			CC	CT	TT	C	T	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)
	Controles		306 (46,1%)	287 (43,3%)	70 (10,6%)	899 (67,8%)	427 (32,2%)				
	Casos de AR	Total	305 (48,7%)	275 (43,9%)	46 (7,4%)	885 (70,7%)	367 (29,3%)			0,112	0,87 (0,74-1,04)
		Anti-CCP+	138 (49,1%)	124 (44,1%)	19 (6,8%)	400 (71,2%)	162 (28,8%)	0,584	0,93 (0,71-1,22)	0,148	0,85 (0,68-1,06)
		Anti-CCP-	125 (46,8%)	122 (45,7%)	20 (7,5%)	372 (69,7%)	162 (30,3%)			0,434	0,92 (0,73-1,15)
		FR+	180 (47,9%)	169 (44,9%)	27 (7,2%)	529 (70,4%)	223 (29,6%)	0,831	0,97 (0,73-1,29)	0,229	0,89 (0,73-1,08)
		FR-	84 (48,0%)	76 (43,4%)	15 (8,6%)	244 (69,7%)	106 (30,3%)			0,493	0,91 (0,70-1,19)
		EC+	137 (45,1%)	138 (45,4%)	29 (9,5%)	412 (67,8%)	196 (32,2%)	0,045	1,31 (1,00-1,73)	0,988	1,00 (0,81-1,24)
		EC-	121 (51,9%)	100 (42,9%)	12 (5,2%)	342 (73,4%)	124 (26,6%)			0,024	0,76 (0,60-0,97)
		<i>PTPN22</i> +	63 (58,3%)	40 (37,1%)	5 (4,6%)	166 (76,8%)	50 (23,2%)	0,028	0,68 (0,48-0,98)	0,008	0,63 (0,45-0,90)
		<i>PTPN22</i> -	242 (46,7%)	235 (45,4%)	41 (7,9%)	719 (69,4%)	317 (30,6%)			0,405	0,93 (0,78-1,11)
rs6920220			GG	GA	AA	G	A	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)
	Controles		421 (65,6%)	197 (30,7%)	24 (3,7%)	1039 (80,9%)	245 (19,1%)				
	Casos de AR	Total	391 (62,6%)	204 (32,6%)	30 (4,8%)	986 (78,9%)	264 (21,1%)			0,200	1,14 (0,93-1,39)
		Anti-CCP+	164 (58,2%)	100 (35,5%)	18 (6,4%)	428 (75,9%)	136 (24,1%)	0,080	1,29 (0,96-1,74)	0,014	1,35 (1,05-1,72)
		Anti-CCP-	171 (64,3%)	85 (31,9%)	10 (3,8%)	427 (80,3%)	105 (19,7%)			0,747	1,04 (0,80-1,36)
		FR+	222 (58,9%)	132 (35,0%)	23 (6,1%)	576 (76,4%)	178 (23,6%)	0,010	1,53 (1,09-2,16)	0,015	1,31 (1,05-1,64)
		FR-	119 (68,8%)	50 (28,9%)	4 (2,3%)	288 (83,2%)	58 (16,8%)			0,325	0,85 (0,62-1,18)
		EC+	193 (63,5%)	99 (32,6%)	12 (3,9%)	485 (79,8%)	123 (20,2%)	0,106	0,79 (0,58-1,06)	0,555	1,08 (0,84-1,38)
		EC-	136 (58,6%)	79 (34,1%)	17 (7,3%)	351 (75,6%)	113 (24,4%)			0,015	1,37 (1,05-1,77)
		<i>PTPN22</i> +	69 (63,9%)	35 (32,4%)	4 (3,7%)	173 (80,1%)	43 (19,9%)	0,631	0,91 (0,62-1,34)	0,775	1,05 (0,72-1,54)
		<i>PTPN22</i> -	322 (62,3%)	169 (32,7%)	26 (5,0%)	813 (78,6%)	221 (21,4%)			0,171	1,15 (0,94-1,42)

La estadística muestra el efecto del alelo minoritario vs. el mayoritario. OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confianza; Anti-CCP= anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado. FR= factor reumatoide EC= epítipo compartido; *PTPN22*= marcador *PTPN22 1858T*.

Al estratificar al grupo de pacientes de acuerdo a los dos principales factores genéticos de susceptibilidad a padecer enfermedad seropositiva, el epítipo compartido y/o *PTPN22* 1857T^{59,172} (Tabla 11), no se observaron diferencias significativas en la distribución de rs6920220 o rs10499194 tras la corrección por Bonferroni. Sin embargo, encontramos unos interesantes resultados al estudiar el marcador rs6920220 en combinación con el EC y el alelo *PTPN22* 1858T en pacientes de AR, atendiendo a la presencia/ausencia de anticuerpos anti-CCP (Tabla 12). La frecuencia del alelo minoritario del rs6920220 era muy alta en pacientes de AR con serología positiva pero carentes de los alelos de susceptibilidad de EC y *PTPN22* C1858T, en comparación con el total de muestras control (42 de 138, 30% vs. 245 de 1284, 19% ; $p=0,001$; $p_c=0,018$ (total de 18 comparaciones analizadas)). El hecho de que el rs6920220 se asocie a anti-CCP pero presente una tendencia de distribución en sentido contrario al de estos factores de susceptibilidad, sugiere que este SNP u otro en LD con él pudiera estar implicado en el desarrollo de anticuerpos anti-CCP mediante una vía distinta que el EC y *PTPN22*. Sin embargo, al analizar este hallazgo en 207 muestras independientes de AR provenientes del HULP no observamos replicación (Tabla 12), quizás debido a que la potencia de este segundo análisis era menor de un 50%.

Tabla 12: Distribución alélica y frecuencia del alelo minoritario (MAF) del polimorfismo rs6920220 entre cuatro grupos de pacientes de AR atendiendo a la presencia/ausencia de *PTPN22* o EC y anticuerpos anti-CCP, y en el total de controles.

Muestra	PTPN22 o EC	anti-CCP	rs6920220		
			G	A	MAF
Casos de AR del HCSC	-	+	96	42	30% ^{a,b}
	-	-	156	48	24%
	+*	+	283	77	21%
	+*	-	210	48	19%
Casos de AR del HULP	-	+	60	12	17% ^{c,d}
	-	-	73	15	18%
	+*	+	160	34	18%
	+*	-	45	15	15%
Controles			1039	245	19%

HCSC= Hospital Clínico San Carlos; HULP= Hospital Universitario La Paz; Anti-CCP= anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado; FR= factor reumatoide; EC= epítipo compartido; *incluyendo los pacientes de AR doble positivos; ^a $p=0,029$ entre individuos del HCSC seropositivos para anticuerpos anti-CCP según presencia/ausencia de *PTPN22*/EC; ^b $p=0,001$ entre pacientes de AR seropositivos *PTPN22*/ EC negativos y controles reclutados en el HCSC; ^c $p=0,869$ entre individuos seropositivos para anticuerpos anti-CCP reclutados en el HULP según presencia/ausencia de *PTPN22*/EC; ^d $p=0,61$ entre pacientes de AR seropositivos *PTPN22*/ EC negativos, y controles reclutados en el HULP.

Nuestro estudio en 6q23 del polimorfismo rs10499194 (Tabla 11) no detectó el efecto de protección del alelo minoritario a AR previamente descrito en la bibliografía ($OR=0,75$)⁸¹, quizás debido a que la potencia del estudio era de un 69%. Este polimorfismo se ha asociado a población norteamericana (consultar los datos de NARAC y BRASS (*Brigham Rheumatoid Arthritis Sequential Study*) de la Tabla 1 del estudio de Plenge⁸¹) con una $OR \approx 0,68$. Los datos del WTCCC¹⁵⁸, con 3000 controles y 2000 pacientes de AR, detectaron una débil asociación del SNP rs13207033 ($r^2=1$ con rs10499194) con AR ($OR=0,89$), muy similar al efecto detectado en EIRA ($OR=0,94$) y en nuestra población ($OR=0,87$). Además, al combinar en un único estudio todas las poblaciones europeas observamos un débil efecto protector del rs10499194 ($OR_{MH}=0,89$ $p_{MH}=0,005$). Los test de homogeneidad muestran diferencias significativas entre la población norteamericana y la europea, al igual que ocurría en el análisis de datos de *TRAF1/C5* y podemos de nuevo postular que la asociación de este polimorfismo en población europea es más débil que en población norteamericana (Figura 18).

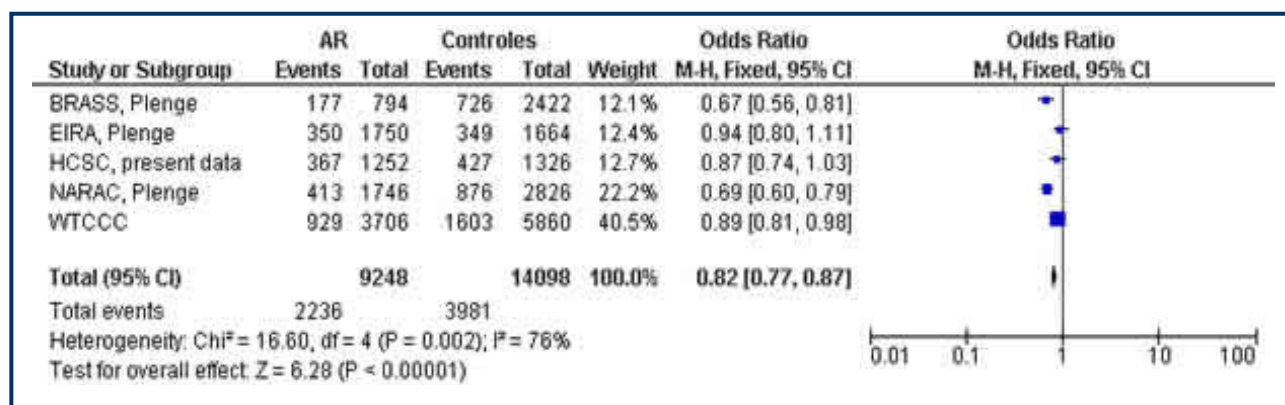


Figura 18: Análisis de los estudios publicados del polimorfismo rs10499194 o del polimorfismo rs1320733 ($r^2=1$) en pacientes caucásicos de AR con anticuerpos anti-CCP. Véase que el efecto de protección en población norteamericana (BRASS y NARAC) es mayor que en población europea.

Sucesivos estudios de la región 6q23 parecen indicar que ésta representa un factor de susceptibilidad común a enfermedades autoinmunes, pues se ha asociado también a AIJ¹¹⁰, LES¹¹⁶, Ps¹¹⁷, DT1¹¹⁸ y ECe⁹⁸. Actualmente se piensa que las dos variantes genéticas descritas en 6q23 en AR señalan asociaciones diferentes y que existen varios factores etiológicos, al menos tres, afectando a la AR de forma independiente¹⁷³. Resulta pues necesaria una re-secuenciación y un mapeo detallado de la región 6q23, así como la realización de estudios funcionales para tratar de establecer el/los factores etiológicos y determinar si realmente existen señales independientes o una sola marcada por distintos polimorfismos.

1.12. Estudios de Interacciones

A pesar de los grandes avances realizados en el campo de la genética en los últimos tres años, resta explicar más del 50% de la heredabilidad total de la AR³⁸. Por ello, se cree que otros factores hereditarios como SNPs de baja frecuencia, microsatélites, CNVs, factores epigenéticos, interacciones genético-ambientales o interacciones gen-gen deben estar implicados en el desarrollo de la enfermedad. El concepto de interacción genética implica que el efecto de un polimorfismo en una enfermedad depende de otras variantes presentes en el individuo. Dicho de otro modo, la penetrancia de un factor genético varía entre pacientes según su trasfondo genético, y así, existen *loci* de susceptibilidad en determinados subgrupos de enfermos, que sólo podrán ser detectados al realizar estudios estratificados. Si esos factores genéticos fueran estudiados en la población total, muy probablemente se describiría una falta de asociación debido a que el efecto del factor de susceptibilidad se encontraría diluido en el conjunto de la enfermedad. Los estudios de estratificación pueden, como ya hemos comentado, ser empleados en el aumento de la especificidad de un estudio.

En este trabajo realizamos estudios de interacciones candidatas y otras libres de hipótesis. El análisis de interacciones candidatas incluyen dos epistasis propuestas por nuestro grupo de investigación (*TNFRSF14* con *TNFRSF6B* y *FOXP3* con *CD40*, *CTLA4* e *IL2*). Puesto que la replicación de un estudio es un elemento indispensable en la validación de factores de susceptibilidad en un subgrupo de enfermos, analizamos las interacciones *IL1-SELS*¹³¹ (en 2q13 y 15q26, respectivamente) y *RTN4-GLIS3* (en 9p24 y 2p16, respectivamente) descritas en la bibliografía¹³², pero cuya replicación no ha sido publicada hasta el momento. El análisis de interacciones libre de hipótesis se realizó en un conjunto de 43 polimorfismos pertenecientes a 17 regiones cromosómicas distintas y que se relacionan con procesos inflamatorios.

1.12.1. Interacción candidata: *TNFRSF14-TNFRSF6B*

El polimorfismo rs6684865 ($r^2=1$ con rs10910099 previamente asociado a AR), localizado en la región 1p36 que incluye al *locus TNFRSF14*, se ha asociado recientemente a la susceptibilidad a la AR mediante un meta-análisis de GWAS y un trabajo de *follow-up*^{38,39}. La potencia para detectar el débil efecto descrito originariamente (OR=0,9) en nuestras muestras sería insuficiente (potencia estimada en menos del 50%). Por ello nos propusimos estudiar el efecto del alelo G de susceptibilidad de este polimorfismo en un subgrupo homogéneo de pacientes según la presencia/ausencia anticuerpos anti-CCP, FR, EC y diferencias de sexo. Así mismo analizamos la posible implicación en estos subgrupos de enfermos del polimorfismo rs4809330 recientemente asociado a EII pediátrica¹³³, localizado en 20q13 (OR=0,74) y también relacionado con un receptor miembro de la superfamilia del TNF (*TNFRSF6B*). La Figura 19 muestra la implicación de las proteínas TNFRSF14 y TNFRSF6B en la respuesta inmune.

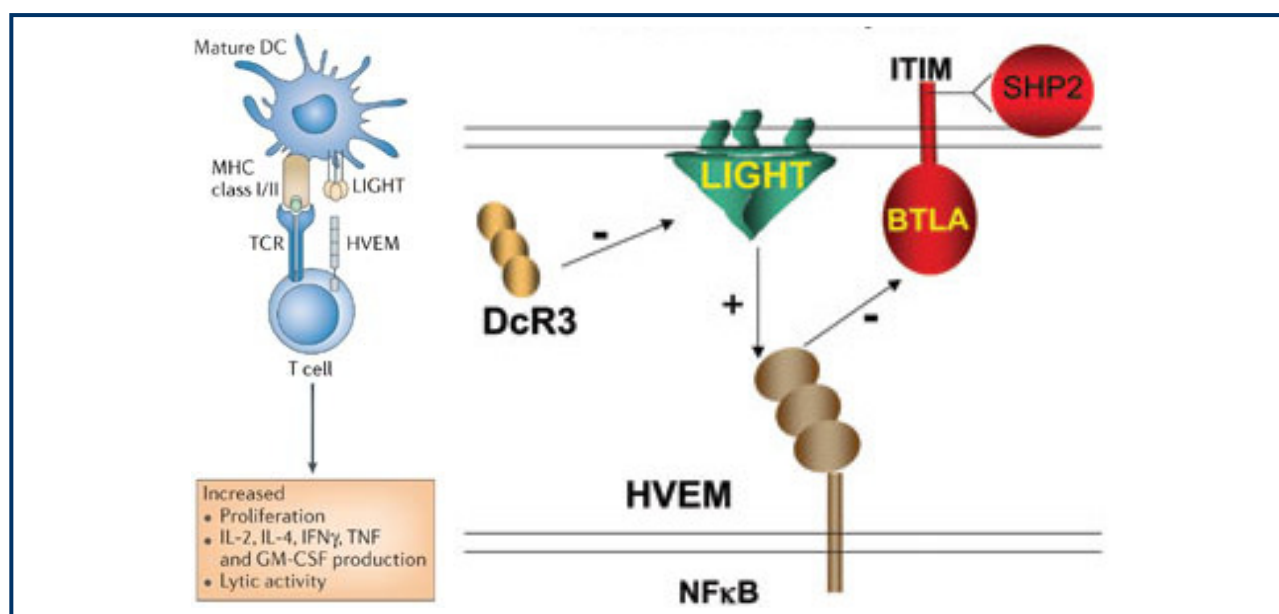


Figura 19: Implicación de TNFRSF14 (HVEM) y TNFRSF6B (DcR3) en la respuesta inmune. La figura de la izquierda se ha obtenido de Murphy *et al.*, 2006¹⁷⁴ y la figura de la derecha de del libro *Therapeutic targets of the TNF superfamily*¹⁷⁵. DC= célula dendrítica; BTLA= *B and T lymphocyte attenuator*; ITIM= *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*; SHP2= *protein-tyrosine phosphatase, non receptor type 11*. GM-CSF= *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*.

No se observaron diferencias significativas en las distribuciones genéticas de los polimorfismos rs6684865 y rs4809330 entre distintos subgrupos de pacientes de AR (ni entre el global de pacientes y controles, como cabía esperar) (Tabla 13).

Resultados y Discusión

Tabla 13: Distribución genotípica y alélica de los polimorfismos rs6684865 (*TNFRSF14*) y rs4809330 (*TNFRSF6B*) en individuos control y casos de AR, totales y estratificados por la presencia/ausencia de EC y de anticuerpos anti-CCP, FR y sexo.

SNP	Muestra	Genotipos n (%)			Alelos n (%)		Estadística	
rs6684865		GG	GA	AA	G	A	p	OR (95% IC)
	Controles	241 (45,6%)	224 (42,5%)	63 (11,9%)	706 (66,9%)	350 (33,1%)	0,147	1,14 (0,95-1,37)
	Casos de AR	301 (49,2%)	251 (41,0%)	60 (9,8%)	853 (69,7%)	371 (30,3%)		
	EC+	127 (43,9%)	132 (45,7%)	30 (10,4%)	386 (66,8%)	192 (33,2%)	0,185	
	EC-	115 (52,3%)	81 (36,8%)	24 (10,9%)	311 (70,7%)	129 (29,3%)		
	Anti-CCP+	129 (46,6%)	118 (42,6%)	30 (10,8%)	376 (67,9%)	178 (32,1%)	0,236	
	Anti-CCP-	133 (51,8%)	100 (38,9%)	24 (9,3%)	366 (71,2%)	148 (28,8%)		
	FR +	172 (49,4%)	139 (39,9%)	37 (10,6%)	483 (69,4%)	213 (30,6%)	0,799	
	FR-	80 (51,3%)	59 (37,8%)	17 (10,9%)	219 (70,2%)	93 (29,8%)		
	Mujer	217 (49,5%)	170 (38,8%)	51 (11,6%)	604 (68,9%)	272 (31,1%)	0,357	
	Hombre	77 (50,0%)	67 (43,5%)	10 (6,5%)	221 (71,8%)	87 (28,2%)		
rs4809330		GG	GA	AA	G	A	p	OR (95% IC)
	Controles	274 (51,3%)	206 (38,6%)	54 (10,1%)	754 (70,6%)	314 (29,4%)	0,732	1,03 (0,86-1,24)
	Casos de AR	300 (49,4%)	265 (43,7%)	42 (6,9%)	865 (71,3%)	349 (28,7%)		
	EC+	135 (45,5%)	140 (47,1%)	22 (7,4%)	410 (69,0%)	184 (31,0%)	0,129	
	EC-	120 (53,3%)	90 (40,0%)	15 (6,7%)	330 (73,3%)	120 (26,7%)		
	Anti-CCP+	136 (49,1%)	124 (44,8%)	17 (6,1%)	396 (71,5%)	158 (28,5%)	0,874	
	Anti-CCP-	127 (49,0%)	114 (44,0%)	18 (6,9%)	368 (71,0%)	150 (29,0%)		
	FR+	169 (48,3%)	160 (45,7%)	21 (6,0%)	498 (71,1%)	202 (28,9%)	0,521	
	FR-	84 (53,2%)	63 (39,9%)	11 (7,0%)	231 (73,1%)	85 (26,9%)		
	Mujer	221 (50,2%)	187 (42,5%)	32 (7,3%)	629 (71,5%)	251 (28,5%)	0,746	
	Hombre	77 (49,4%)	72 (46,2%)	7 (4,5%)	226 (72,4%)	86 (27,6%)		

La estadística muestra el efecto del alelo mayoritario vs. el minoritario. OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confianza.

Dado que ambos SNPs (rs6684865 y rs4809330) se han asociado a enfermedades autoinmunes, se localizan en regiones que codifican miembros de la superfamilia de receptores del TNF, y que los polipéptidos codificados comparten un mismo ligando (LIGHT) cuya expresión está incrementada en el sinovio de pacientes de AR¹⁷⁶, decidimos investigar el efecto combinado de ambos SNPs en pacientes con AR (Tabla 14). Se observaron diferencias significativas en la distribución alélica del polimorfismo rs6684865 entre pacientes de AR portadores y no portadores del alelo A del polimorfismo rs4809330. La frecuencia del alelo de susceptibilidad G del rs6684865 en el grupo de pacientes de AR que portaba el genotipo GG de susceptibilidad para el SNP rs4809330 era mayor que en el resto de pacientes (73,7% vs. 66,6%; $p=0,002$) o que en controles sin estratificar por genotipos (66,6%, $p=0,003$). Estos resultados seguían siendo significativos tras la corrección por Bonferroni ($p_c=0,018$ y $p_c=0,027$, respectivamente). Para descartar la aparición de resultados espurios, intentamos replicar esta asociación en un grupo independiente de pacientes de AR y controles (HULP). Nuevamente, la frecuencia del alelo de susceptibilidad G del rs6684865 era significativamente mayor en el grupo de pacientes portadores del genotipo GG del rs4809330 que en el resto de pacientes (77,5% vs. 55,8%; $p=0,037$) o que en controles sin estratificar (66,3%; $p=0,002$). Puesto que no se observaron diferencias significativas entre enfermos y controles sin estratificar de ambos grupos en estudio, combinamos los datos (Tabla 14). Además de mejorar la significación, se observa que el efecto del alelo G de rs6684865 en el grupo de pacientes portadores del genotipo GG de susceptibilidad del SNP rs4809330, con respecto a controles estratificados ($OR=1,40$), difería del observado en el grupo de individuos portadores del alelo A para rs4809330 ($OR=1,03$; test de homogeneidad $p=0,0498$).

Tabla 14: Distribución genotípica y alélica del polimorfismo rs6684865 teniendo en cuenta el genotipo del polimorfismo rs4809330, en el primer grupo caso-control en estudio, en el grupo de replicación y en ambos grupos combinados.

Estudio	Muestra	rs4809330	rs6684865						
			Genotipos n (%)			Alelos n (%)		Estadística G vs. A	
			GG	GA	AA	G	A	p	OR
Primer Estudio (HCSC)	Casos	GG	162 (56,0%)	102 (35,3%)	25 (8,7%)	426 (73,7%)	152 (26,3 %)	0,037	1,32 (1,01-1,72)
	Controles	GG	127 (47,2%)	112 (41,6%)	30 (11,2%)	366 (68,0%)	172 (32,0%)		
	Casos	GA+AA	127 (42,5%)	138 (46,1%)	34 (11,4%)	392 (65,6%)	206 (34,4%)		
	Controles	GA+AA	110 (43,2%)	112 (43,9%)	33 (12,9%)	332 (65,1%)	178 (34,9%)		
Estudio de Replicación (HULP)	Casos	GG	65 (59,6%)	39 (35,8)%	5 (4,6%)	169 (77,5%)	49 (22,5%)	0,018	1,66 (1,06-2,58)
	Controles	GG	51 (44,7%)	52 (45,6%)	11 (9,7%)	154 (67,5%)	74 (32,5%)		
	Casos	GA+AA	39 (41,0%)	49 (51,6%)	7 (7,4%)	127 (66,8%)	63 (33,2%)		
	Controles	GA+AA	53 (40,1%)	66 (50,0%)	13 (9,9%)	172 (65,2%)	92 (34,8%)		
Estudio Combinado	Casos	GG	227 (57,1%)	141 (35,4%)	30 (7,5%)	595 (74,7%)	201 (25,3%)	0,003	1,40 (1,12-1,76)
	Controles	GG	178 (46,5%)	164 (42,8%)	41 (10,7%)	520 (67,9%)	246 (32,1%)		
	Casos	GA+AA	166 (42,1%)	187 (47,5%)	41 (10,4%)	519 (65,9%)	269 (34,1%)		
	Controles	GA+AA	163 (42,1%)	178 (46,0%)	46 (11,9%)	504 (65,1%)	270 (34,9%)		

La estadística indica el efecto del alelo mayoritario del rs6684865 (descrito como alelo de susceptibilidad en AR) vs. el alelo minoritario.

En resumen, nuestro estudio describe y replica que el efecto del alelo de susceptibilidad G del marcador relacionado con el gen *TNFRSF14* se asocia a un subgrupo homogéneo de pacientes de AR que son portadores del genotipo de susceptibilidad GG del SNP rs4809330, en *TNFRSF6B*. El hecho de que ambos polimorfismos codifiquen para miembros de receptores de la superfamilia del TNF y que puedan interactuar con una misma molécula que además se encuentra sobre-expresada en el sinovio de pacientes con AR, apoya de forma biológica la interacción estadística observada. Creemos que nuestros resultados no son consecuencia del azar, pues mantienen su significación estadística tras la corrección por Bonferroni y han sido replicados en un grupo independiente de pacientes de AR. Este estudio de epistasis entre SNPs relacionados con los genes *TNFRSF14* y *TNFRSF6B*, implica que ambos polimorfismos se encuentran asociados a la AR (con un efecto en la susceptibilidad a AR significativamente mayor al publicado) y no sólo el locus *TNFRSF14* como se encuentra descrito. Creemos que la asociación *TNFRSF14* con AR ha podido ser detectada en el conjunto general de pacientes de AR en otros estudios gracias a la gran potencia de los análisis realizados. Puesto que, como se señaló anteriormente el SNP relacionado con *TNFRSF6B* se ha asociado a EII pediátrica, y el SNP relacionado con *TNFRSF14* se ha relacionado con ECe, la implicación de ambos polimorfismos en AR añade nuevas evidencias de que distintas enfermedades autoinmunes comparten vías patogénicas.

1.12.2. Interacción candidata: *FOXP3*-*CD40*, *CTLA4* e *IL2*

Dado que las alteraciones en el desarrollo y la función de las células Treg pueden causar enfermedades inflamatorias autoinmunes¹⁷⁷, analizamos la interacción genética entre haplotipos del gen *FOXP3* y polimorfismos en las regiones que codifican las moléculas *CD40*, *CTLA4* e *IL-2* (Figura 20).

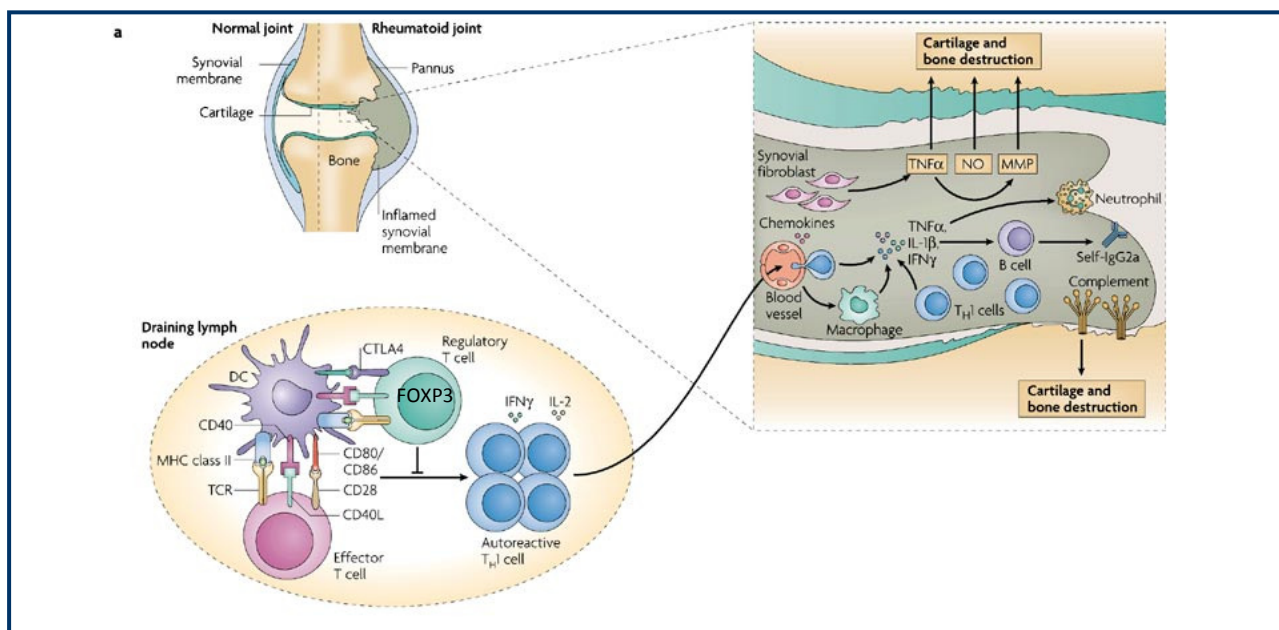


Figura 20: Implicación de FOXP3, CD40, CTLA4 e IL2 en la respuesta inmune. Figura obtenida de González-Rey *et al.*, 2007¹⁷⁸.

DC= célula dendrítica; NO= óxido nítrico.

Estudios previos muestran que al alelo 15 del microsatélite GT_n en *FOXP3* es un marcador de susceptibilidad en DT1 en población japonesa¹⁷⁹, por lo que realizamos nuestros análisis según la presencia/ausencia de dicho alelo. No se observaron diferencias significativas en las distribuciones alélicas de las variantes genéticas estudiadas en la región *FOXP3* atendiendo al sexo entre pacientes de AR y controles (Tabla 15). La división entre sexos es necesaria en este trabajo ya que el gen *FOXP3* se localiza en el cromosoma X. Las variantes en estudio fueron el microsatélite GT_n y los SNPs rs2294020, rs2280883 y rs4824747.

Tabla 15: Distribución alélica de los marcadores estudiados en el gen *FOXP3* en pacientes de AR e individuos control.

Marcadores	Muestra	Sexo	Alelos n (%)		Estadística	
Microsatélite GT _n			15	Resto	p	OR (95% IC)
	Controles	Mujeres	462 (56,6%)	354 (43,4%)	0,396	1,08 (0,91-1,28)
		Hombres	206 (58,2%)	148 (41,8%)		
	Casos de AR	Mujeres	512 (57,8%)	374 (42,2%)		
		Hombres	98 (65,3%)	52 (34,7%)		
rs2294020			G	A	p	OR (95% IC)
	Controles	Mujeres	631 (76,0%)	199 (24,0%)	0,587	0,95 (0,77-1,16)
		Hombres	290 (80,1%)	72 (19,9%)		
	Casos de AR	Mujeres	662 (78,1%)	186 (21,9%)		
		Hombres	118 (79,2%)	31 (20,8%)		
rs2280883			T	C	p	OR (95% IC)
	Controles	Mujeres	425 (51,2%)	405 (48,8%)	0,108	1,15 (0,97-1,36)
		Hombres	185 (50,8%)	179 (49,2%)		
	Casos	Mujeres	411 (48,3%)	439 (51,7%)		
		Hombres	65 (43,6%)	84 (56,4%)		
rs4824747			G	T	p	OR (95% IC)
	Controles	Mujeres	722 (87,6%)	102 (12,4%)	0,141	1,22 (0,93-1,6)
		Hombres	319 (87,2%)	47 (12,8%)		
	Casos de AR	Mujeres	764 (89,7%)	88 (10,3%)		
		Hombres	131 (88,5%)	17 (11,5%)		

Estadística del total de pacientes vs. el total de controles al no observar diferencias significativas entre sexos. La OR muestra el efecto del alelo minoritario vs. el alelo mayoritario. OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confianza.

En el estudio de haplotipos observamos una combinación alélica de susceptibilidad nominalmente significativa que incluye al alelo 15 del microsatélite GT_n, el haplotipo 15GCG (definido por el microsatélite GT_n, rs2294020, rs2280883, rs4824747) (p=0,026). Al corregir este resultado por el número de comparaciones realizadas, este haplotipo pierde su significación estadística. Sin embargo en el análisis de interacciones que era el objetivo de este estudio, comparamos la distribución alélica de los marcadores de *CD40*, *CTLA4* e *IL2* en individuos portadores/no portadores de este haplotipo. La Tabla 16 muestra las frecuencias génicas de los polimorfismos *CTLA4* e *IL2* (las frecuencias del SNP en *CD40* se pueden consultar en la Tabla 6).

Tabla 16: Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs en las regiones de *CTLA4* (rs3087243) e *IL2* (rs6822844).

SNP	Muestra	Genotipos n (%)			Alelos n (%)		Estadística	
rs3087243		AA	AG	GG	A	G	p	OR (95% IC)
	Controles	200	369	185	769	739	0,615	0,96 (0,82-1,12)
		(26,5%)	(48,9%)	(24,5%)	(51%)	(49%)		
	Casos de AR	181	274	157	636	588		
		(29,6%)	(44,8%)	(25,7%)	(52%)	(48%)		
rs6822844		GG	GT	TT	G	T	p	OR (95% IC)
	Controles	582	190	10	1354	210	0,539	0,93 (0,73-1,18)
		(74,4%)	(24,3%)	(1,3%)	(86,6%)	(13,4%)		
	Casos de AR	419	125	7	963	139		
		(76,0%)	(22,7%)	(1,3%)	(87,4%)	(12,6%)		

Estadística de alelo minoritario vs. el mayoritario. OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confianza.

Tal y como se indica en la Tabla 17, observamos diferencias nominalmente significativas en la distribución alélica de los tres polimorfismos asociados con AR, localizados en las regiones de los correspondientes genes (rs1883832 (*CD40*), rs3087243 (*CTLA4*) y rs6822844 (*IL2/IL21*)), entre pacientes de AR portadores del haplotipo 15GCG y el resto de pacientes. Sin embargo, también se observaron diferencias en la distribución alélica del rs1883832 en los individuos control, lo que sugiere que esta interacción no está implicada en la susceptibilidad a la enfermedad. Estos resultados pueden ser consecuencia del azar, procesos de selección o por estratificación de la población. Decidimos replicar la asociación más convincente, aquella que implica al polimorfismo rs3087243 (*CTLA4*). Al analizar esta última asociación en un grupo independiente de enfermos de AR reclutados en el HULP observamos que la distribución alélica del SNP en *CTLA4* difiere entre sexos (datos no mostrados). El resultado observado en mujeres del grupo de replicación es significativo ($p=0,012$). Sin embargo, el efecto se dirige en sentido contrario al grupo de mujeres del primer estudio. Por lo tanto la asociación no se replica y podría deberse a que el primer efecto observado fuera un resultado espurio.

Tabla 17: Distribución alélica de los polimorfismos rs1883832 (*CD40*), rs3087243 (*CTLA4*) y rs6822844 (*IL2*) en individuos control y casos de AR portadores/no portadores del haplotipo de *FOXP3* 15GCG (conformado por el microsatélite, rs2294020, rs4824747 y rs2280883, respectivamente).

Marcador	Muestra	Haplotipo <i>FOXP3</i>	Hombres		Mujeres		Total		p	OR
Alelos del rs1883832			C	T	C	T	C	T		
	Controles	15GCG	204 (68,5%)	94 (31,5%)	239 (72,2%)	92 (27,8%)	443 (70,4%)	186 (29,6%)	0,043	1,27 (1,00-1,61)
		Resto	295 (71,6%)	117 (28,4%)	357 (78,3%)	99 (21,7%)	652 (75,1%)	216 (24,9%)		
	Casos de AR	15GCG	87 (68,0%)	41 (32,0%)	239 (69,5%)	105 (30,5%)	326 (69,1%)	146 (30,9%)	0,021	1,38 (1,04-1,83)
		Resto	102 (70,8%)	42 (29,2%)	314 (77,1%)	93 (22,9%)	416 (75,5%)	135 (24,5%)		
Alelos del rs3087243			A	G	A	G	A	G		
	Controles	15GCG	150 (51,4%)	142 (48,6%)	159 (50,6%)	155 (49,4%)	309 (51,0%)	297 (49,0%)	0,9555	0,99 (0,8-1,23)
		Resto	205 (51,5%)	193 (48,5%)	218 (50,2%)	216 (49,8%)	423 (50,8%)	409 (49,2%)		
	Casos de AR	15GCG	65 (45,8%)	77 (54,2%)	178 (47,3%)	198 (52,7%)	243 (46,9%)	275 (53,1%)	0,0019	1,45 (1,14-1,86)
		Resto	80 (55,6%)	64 (44,4%)	249 (56,5%)	192 (43,5%)	329 (56,2%)	256 (43,8%)		
Alelos del rs6822844			G	T	G	T	G	T		
	Controles	15GCG	259 (87,5%)	37 (12,5%)	286 (86,1%)	46 (13,9%)	545 (86,8%)	83 (13,2%)	0,696	0,94 (0,69-1,28)
		Resto	360 (87,4%)	52 (12,6%)	401 (85,0%)	71 (15,0%)	761 (86,1%)	123 (13,9%)		
	Casos de AR	15GCG	118 (85,5%)	20 (14,5%)	288 (85,2%)	50 (14,8%)	406 (85,3%)	70 (14,7%)	0,041	1,63 (1,09-2,44)
		Resto	117 (86,0%)	19 (14,0%)	365 (90,1%)	40 (9,9%)	482 (90,4%)	51 (9,6%)		

El análisis estadístico revela el efecto (OR) del alelo minoritario vs. el alelo mayoritario del total de pacientes y controles. OR= *odds ratio*.

1.12.3. Replicación de la interacción: *IL1-SELS*

La IL-1 es una citoquina mediadora de la inflamación cuya actividad refleja la función de dos moléculas IL-1 α e IL-1 β . Se ha observado que en AR, la IL-1 participa en el proceso de inflamación y destrucción articular, y que la terapia basada en su bloqueo mejora la clínica de la enfermedad¹⁸⁰. Además, varios estudios han asociado polimorfismos en la región 2q13, donde se localizan los genes *IL1A* e *IL1B*, con formas severas, erosivas o de progresión en AR¹⁸¹⁻¹⁸⁴, en concordancia con lo que sucede en el modelo K/BxN de ratón¹⁸⁵, donde existen distintas formas de severidad de la enfermedad asociadas con un polimorfismo en *Il1b*. Recientemente se ha descrito una interacción entre los polimorfismos rs16944 (*IL1*) y rs28665122¹³¹ (*SELS*) en población francesa que refuerza la teoría de que la región de *IL1* constituye un factor de susceptibilidad en un subgrupo de enfermos. Además, la interacción de *IL1-SELS* parece biológicamente razonable, ya que el alelo A del marcador *SELS* analizado aumenta la producción de distintas citoquinas proinflamatorias entre las que se encuentra IL-1¹⁵². Los estudios del WTCCC no muestran asociación del *locus SELS* con AR¹⁵⁸. Nosotros tratamos de replicar esta interacción en pacientes de AR españoles. En nuestro estudio no se observan diferencias significativas en la distribución de portadores/no portadores del alelo A del rs28665122 entre individuos homocigotos para el alelo minoritario del rs16944 (38 de 123, 30,9%) y el resto de enfermos de AR (228 de 889, 25,6%; $p=0,215$; OR=1,30 (0,84-1,99)) (Tabla 18), a pesar de que la potencia para detectar el efecto descrito inicialmente (OR=2,26) era de un 97%.

Tabla 18: Análisis de interacción entre los polimorfismos rs16944 (*IL1*) y rs28665122 (*SELS*) en casos de AR.

		rs16944	
		AG+GG	AA
rs28665122	AA+AG	228 (25,6%)	38 (30,9%)
	GG	661 (74,4%)	85 (69,1%)

El análisis estadístico revela el efecto del alelo minoritario vs. el alelo mayoritario.

La falta de asociación podría deberse a diferencias entre las poblaciones en estudio, o a que el resultado obtenido previamente fuera fruto del azar. Es posible que la frecuencia de individuos con una artritis severa difiera entre ambas poblaciones y que por ello los resultados entre poblaciones varíen de forma tan significativa. La falta de este tipo de datos en ambos estudios no nos permite determinar cuál es la causa. De forma similar a nuestro estudio, un trabajo que analizaba 28 *tag* SNPs en esta región tampoco

encontró asociación entre *IL1* y AR o formas erosivas de ésta que soportara la corrección de Bonferroni¹⁸⁶. Es más, los estudios que han asociado esta región a AR difieren en los SNPs e incluso a veces en los alelos asociados, lo que hace pensar que la asociación de *IL1* a formas erosivas de AR no sea real.

1.12.4. Replicación de la interacción: *RTN4-GLIS3*

Dado que un estudio de barrido genómico en población española proponía la existencia de una interacción entre los marcadores rs10171653 (*RTN4*) y rs7033413 (*GLIS3*), decidimos analizar de forma combinada ambos polimorfismos en busca de la replicación del hallazgo (nótese que la equivalencia de rs10171653 con rs17046477, aquí analizado, es del 100%, $r^2=1$; ver Tabla 19). Esta decisión fue tomada porque a pesar de que la significación estadística de la interacción en el estudio original ($5,69 \times 10^{-12}$) no supera el nivel de corrección impuesto por tests múltiples ($1,2 \times 10^{-12}$), la interacción es muy sugerente, teniendo además en cuenta que se han asociado recientemente polimorfismos en *GLIS3* a DT1¹⁸⁷. Nuestro trabajo no detecta variaciones significativas de las frecuencias genotípicas del marcador rs17046477 (*RTN4*) al ser estratificado por los distintos genotipos del marcador rs7033413 (*GLIS3*) (Tabla 19).

Tabla 19: Distribución genotípica del estudio combinado de los SNPs rs17046477 (*RTN4*) y rs7033413 (*GLIS3*) en enfermos de AR.

		rs7033413		
		GG	GA	AA
rs17046477	GG	8	1	0
	AG	85	24	1
	AA	329	104	8

Puesto que el estudio en que nos basamos no indica los alelos que interaccionan entre sí, ni el efecto generado por la epistasis, no podemos establecer la potencia de nuestro estudio, pero el número de pacientes analizado es sólo un 3% menor en nuestro trabajo. No observamos la asociación propuesta muy probablemente debido a que la epistasis descrita entre ambos marcadores no sea real.

1.12.5. Análisis de interacciones libres de hipótesis

Con el objetivo de detectar interacciones genéticas sin hipótesis previa estudiamos el LD 2 a 2 entre 43 polimorfismos potencialmente implicados en enfermedades autoinmunes y ubicados en 17 regiones cromosómicas distintas. El análisis del LD reveló la existencia de varios resultados significativos entre polimorfismos localizados en distintos bloques de desequilibrio (Figura 21). El recuento directo en la base de datos de dichos resultados indicó la presencia de una interacción con un valor de $p=0,0005$. Esta interacción implicaba a los polimorfismos rs755622 (cercano al gen *MIF*) y rs3020444 (presente en el gen *ESR2*, que codifica el receptor β de estrógeno). Por azar cabría esperar haber encontrado 0,5 interacciones con un valor de p al menos igual al obtenido, lo cual indica que existe un 50% de probabilidades de que esta interacción sea resultado del azar. Cabe resaltar sin embargo, que la tercera interacción más significativa, incluyera de nuevo al SNP rs755622, esta vez interaccionando con el polimorfismo rs13422767 (localizado en el locus *FAP/IFIH1/KCNH7* que ha sido asociado a DT1¹⁴⁶). De forma similar a lo que ocurre en nuestro trabajo, un reciente estudio de interacciones genéticas en AR de 27 regiones candidatas que analizaban 531 SNPs subraya el importante papel de *MIF* en la patogenia de la AR al interaccionar con otros genes¹²⁹. Este trabajo no analiza la región *ESR2B*, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados, aunque sí analiza polimorfismos en *IFIH1* sin que se observen interacciones *MIF-IFIH1* estadísticamente significativas. Dado el papel principal que parecía jugar *MIF* en nuestros resultados, decidimos estudiar la presencia combinada de los tres marcadores (*MIF-ESR2B-IFIH1*) en pacientes de AR y controles (Tabla 20).

Tabla 20: Distribución genotípica de los polimorfismos rs755622/rs13422767/rs3020444 en casos, controles y grupo de replicación de AR.

rs755622	rs13422767	rs3020444	Casos de AR HCSC	Controles HCSC	Casos de AR HULP
+	+	+	67	38	32
+	+	-	62	52	50
+	-	+	12	12	23
+	-	-	19	20	13
-	+	+	86	104	83
-	+	-	177	167	141
-	-	+	42	50	42
-	-	-	72	75	60

rs755622(+)= portador del alelo C; rs3020444(+)= TT; rs13422767(+)= GG.

Nuestro estudio no detectó interacción entre los SNPs rs3020444 y rs13422767. El porcentaje de individuos portadores del alelo C para *MIF* es mucho más alto en el grupo de pacientes de AR que además portan los genotipos rs3020444TT y rs13422767GG (67 de 160, 41,9%), que en el resto de pacientes (86 de 377, 22,8%), siendo la diferencia muy significativa ($p=9*10^{-5}$). *MIF* es una citoquina proinflamatoria e inmunoestimuladora que se encuentra aumentada en el fluido sinovial y en el suero de pacientes con AIJ¹⁸⁸. Existen estudios que asocian el polimorfismo -173G/C o el microsatélite CATT (en fuerte LD con el polimorfismo -173G/C) a formas severas de AIJ¹⁸⁸ y AR^{155,189}. Este polimorfismo puede aumentar la producción de *MIF* por introducir potencialmente un lugar de unión al factor de transcripción AP4, aunque los análisis de GWAS en AR no muestran replicación de esta asociación. *ESR2* codifica un receptor nuclear de estrógenos que puede controlar la expresión de ciertos genes de forma directa o indirecta mediante modulación de otros factores de transcripción¹⁹⁰. Polimorfismos en este gen se han asociado a alteraciones en el metabolismo óseo¹⁹¹, que podrían contribuir a la patología de la AR. *IFIH1* codifica una helicasa citosólica capaz de reconocer RNA vírico, habiéndose sugerido que las infecciones víricas pueden estar implicadas en ciertos casos de desarrollo de AR¹⁹².

Este resultado de triple interacción (*MIF/ESR/IFIH1*), debe ser corregido por análisis de tests múltiples, habiendo sido el total de interacciones revisadas en este trabajo de 904. La corrección de Bonferroni resulta excesiva teniendo en cuenta que muchos polimorfismos se encuentran en un mismo bloque de desequilibrio y aún así nuestros resultados corregidos tendrían un nivel de significación de $p_c=0,08$. Decidimos replicar esta triple interacción en un grupo independiente de pacientes de AR del HULP (Tabla 20). En este grupo de replicación se observó que el porcentaje de individuos portadores del alelo C para *MIF* en el grupo de pacientes de AR que además portan los genotipos rs3020444TT y rs13422767GG (32 de 118, 27,1%) era muy parecido al del resto de pacientes (83 de 326, 25,5%). Por lo tanto, no se replicaron los resultados iniciales, a pesar de tener potencia suficiente para detectar el efecto observado originalmente. La interacción observada por lo tanto parece ser un resultado falso positivo.

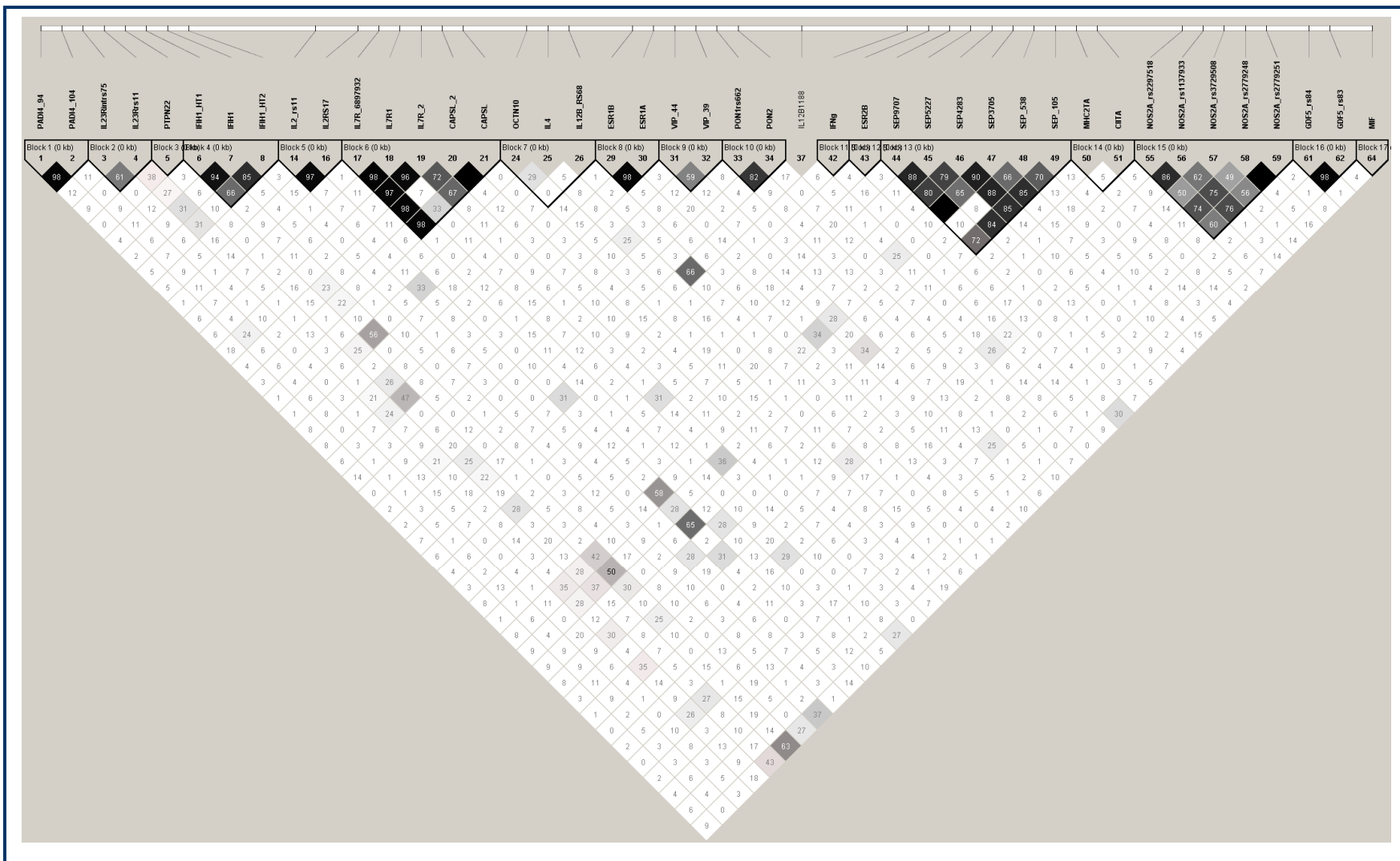


Figura 21: Desequilibrio de ligamiento medido como el cociente D'/LOD entre los 43 polimorfismos localizados en 17 regiones genéticas analizadas. A mayor intensidad de color, mayor es el LD entre los SNPs. D' = desequilibrio de ligamiento; LOD = *logarithm of the odds score*.

6.4 Consideraciones finales

Los mayores avances en el conocimiento de la genética de la AR se han producido en los últimos tres años gracias al desarrollo de la tecnología necesaria para realizar GWAS. Hasta mediados de 2007 sólo se reconocía la existencia de un marcador genético no-*HLA* asociado a la AR, el alelo 1857T en el gen *PTPN22*⁶². Hoy, tres años más tarde, se han descrito convincentemente hasta 22 polimorfismos asociados. La descripción y validación de estos factores genéticos ha ayudado a proponer nuevas hipótesis en la etiopatogenia de la AR, añadiendo evidencias de que no es una entidad homogénea sino que se distinguen al menos dos formas clínicas determinadas por la presencia/ausencia de anticuerpos anti-CCP. Nuestro trabajo de investigación ha pretendido avanzar en el conocimiento de esta compleja y variable inmunopatía mediante el análisis genético de asociación de marcadores a AR y a determinados subgrupos de la enfermedad en población española. Las principales fuentes de asociación espuria han sido controladas a lo largo de este trabajo. No se ha observado estratificación de la población tras el análisis de cinco marcadores EuroAims y se ha controlado el origen de las muestras. Sólo se han considerado positivas las asociaciones replicadas en un grupo independiente de pacientes de AR y/o han superado el nivel de corrección exigido por Bonferroni.

La gran mayoría de los polimorfismos analizados en este trabajo se relacionan con genes que codifican proteínas implicadas en la patogenia de la AR. Tomando como referencia las hipótesis de Klareskog⁵² exponemos en la Figura 22 la posible participación de estos genes, y otros asociados, en los distintos procesos conducentes al desarrollo de la AR:

1- Citrulinización de péptidos: favorecida por factores ambientales como el consumo de tabaco y factores genéticos como el gen *PADI4*.

2- Pérdida de la tolerancia central: favorecida por factores genéticos como *PTPN22*. En este trabajo se especulaba con el posible papel del gen candidato *IL7R* en la predisposición a AR, dicho gen podría estar implicado en este proceso.

3- Pérdida de la tolerancia periférica:

- *Priming* de células T autorreactivas: en esta fase estarían implicadas un gran número de proteínas codificadas por genes recientemente asociados a la AR como *CD58*, *CD2*, *CD28*, *TAGAP*, *CDK6* y *PRKCQ*. El gen candidato *CIITA* podría considerarse en esta fase al estar involucrado en la transcripción de moléculas *HLA* de clase II que presentarían el autoantígeno a las células T.

- Activación de las células B: en este proceso podrían estar implicados *KIF5A/PIP4K2C*, *PRDM1/BLIMP1* y *PTPRC*.

- Diferenciación de las células T: mediada por los genes *STAT4*, *IL2* e *IL2RB* asociados a la enfermedad.
- Activación de las células T: en este proceso podían intervenir las proteínas codificadas por los genes asociados *TRAF1*, *TRAF6*, *REL*, *CD40*, *TNFAIP3* y *TNFRSF14* (los tres últimos *loci* han sido analizados en este trabajo).

4-Inflamación y destrucción articular: en esta fase participan citoquinas inflamatorias codificadas por genes que han sido analizados en este trabajo como *IL1* (cuya producción se encuentra regulada por *SELS*) y *MIF*, así como PGs (uno de cuyos receptores, codificado por *PTGER4* hemos analizado) y numerosas proteínas miembros de la superfamilia de TNF (algunos de cuyos receptores hemos analizado como TNFRSF6B) entre otros. En este estadio la inflamación no puede ser controlada por las células Treg (se proponía la implicación de *FOXP3*, *IL2*, *CD40* y *CTLA4* en esta alteración funcional) y la enfermedad se perpetúa.

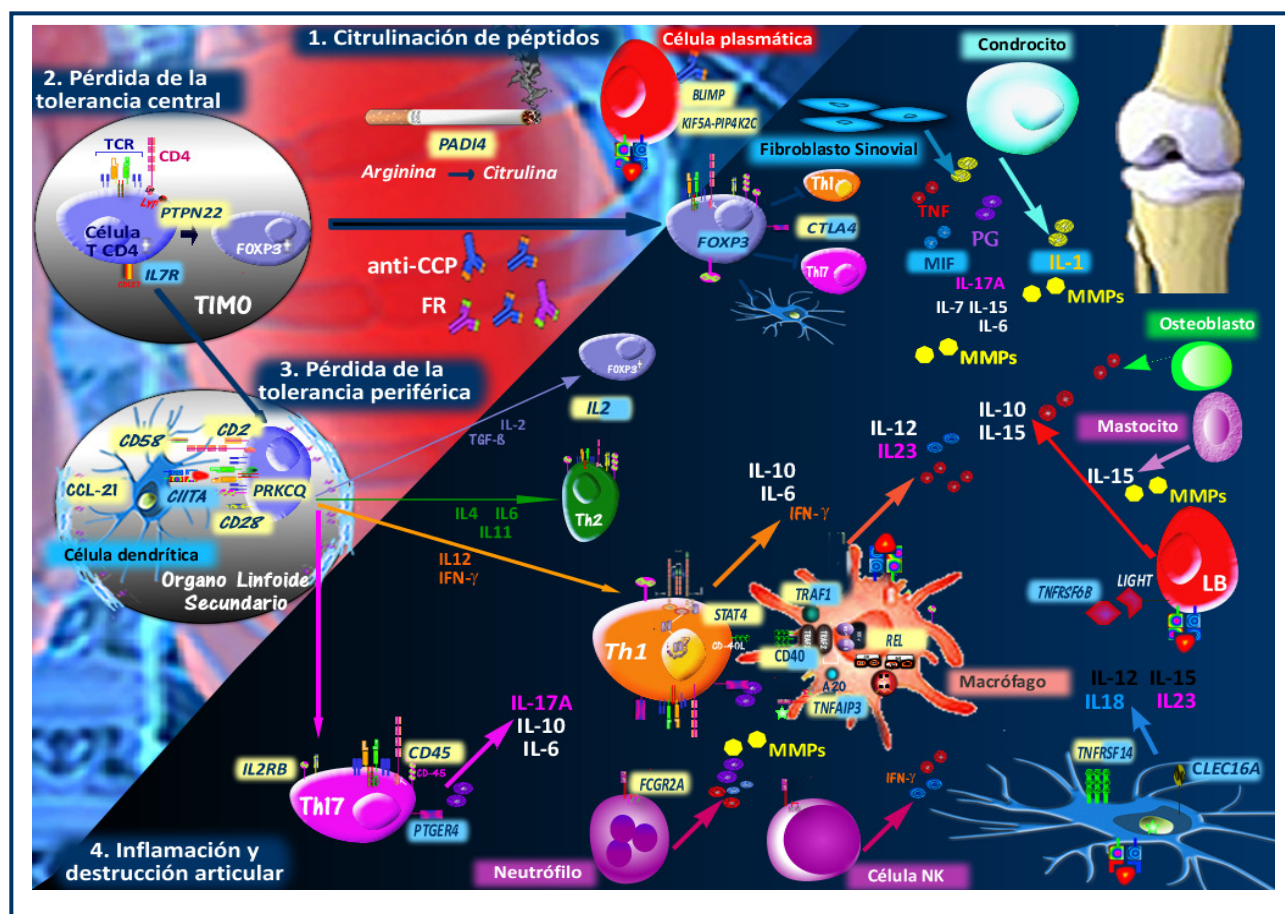


Figura 22: Esquema de la posible relación entre la etiopatogenia y los genes analizados en este trabajo de investigación y otros asociados a la AR. En el cuadro amarillo se muestran los genes asociados y en los cuadros azules los genes analizados.

Los estudios genéticos en AR proponen la existencia de unas pocas variantes génicas con un efecto relativamente alto, y de muchas otras con un efecto muy débil sobre la enfermedad, en concordancia con el carácter poligénico de esta artropatía. En este contexto, nuestro estudio analiza genes en subgrupos de enfermos con el fin de detectar efectos de susceptibilidad no tan moderados. Nuestro trabajo no revela un efecto de asociación de los marcadores estudiados en *CAPSL/IL7R*, *CD40*, *PTGER4* y *CIITA/CLEC16A/SOCS1* en ningún subgrupo de pacientes de AR definidos por sexo, presencia/ausencia de anticuerpos anti-CCP, FR o EC en población española. Debemos tener en cuenta que el efecto de un marcador depende de su r^2 con el factor etiológico y que, por lo tanto, todo estudio conlleva una pérdida de potencia que sólo puede ser compensada con un aumento del tamaño de muestra en estudio en un factor $1/r^2$. Nuestros análisis en la región candidata *CIITA/CLEC16A/SOCS1* sí muestran nuevas evidencias de su asociación con AR en población española al replicar el efecto de susceptibilidad del haplotipo GC de *CIITA* definido por los SNPs rs3087456/rs4774. Este trabajo pone de manifiesto la importancia de realizar análisis de replicación que validen las asociaciones entre marcadores genéticos y la AR, ya que pueden existir diferencias en el LD, interacciones genéticas o interacciones genético-ambientales que modifiquen el efecto de dichos marcadores entre poblaciones. En este sentido, sugerimos que los marcadores rs10499194 (en 6q23) y rs3761847 (en *TRAF1/C5*), que se asocian a AR, presentan un efecto significativamente distinto entre las poblaciones europeas y norteamericanas. El mapeo fino de estas regiones y los análisis funcionales permitirán conocer la relación de estas variantes con el polimorfismo etiológico y discriminar la causa de estas diferencias. En nuestra opinión la aportación más significativa de este trabajo radica en la demostración de la existencia de factores genéticos de susceptibilidad que contribuyen específicamente al desarrollo de AR en ciertos subgrupos de pacientes. En primer lugar confirmamos que el polimorfismo rs6920220 en 6q23 es un buen marcador de susceptibilidad en AR con serología positiva a FR en población española, pues se observan diferencias significativas entre enfermos con y sin este auto-anticuerpo. En segundo lugar aportamos más evidencias al describir interacciones genéticas entre polimorfismos relacionados con miembros de la superfamilia del TNF. Nuestros estudios demuestran que el efecto de una variante hereditaria depende del trasfondo genético de cada individuo y que deberían dirigirse nuevos esfuerzos a establecer una clasificación menos heterogénea de la AR.

7 CONCLUSIONS CONCLUSIONES



1. Association analyses of candidate genes with RA, or with any subgroup of the disease:

- 1.1. Our study of SNPs related with the *CAPSL/IL7R* locus at 5p13.2, *CD40* locus at 20q13 and *PTGER4* locus at 5p13.1 do not show any large size effect of association with any subgroup of RA disease stratified by sex, presence/absence of anti-CCP antibodies, rheumatoid factor or shared epitope in the Spanish population.
- 1.2. Our study shows new evidence of association of the *CIITA/CLEC16A/SOCS1* region at 16p13 with RA in the Spanish population.

2. Implication of markers previously associated with RA disease by GWAS in our population:

- 2.1. The combined analysis of our data and those from others in the *TRAF1/C5* region shows evidence of association of rs3761847 with RA in the European population. Furthermore, the susceptibility effect is significantly weaker than the one observed in the North-American population.
- 2.2. We confirm that rs6920220, located in the 6q23 region is a good marker for seropositive RA susceptibility in the Spanish population. The combined analysis of our data and those from other reports, shows evidence of association of rs10499194, located on the 6q23 region, with RA in the European population. However, the protective effect of rs10499194 is smaller in the European population compared to the North-American population. Additionally, we suggest that rs6920220 or other in LD with it might be involved in an anti-CCP antibodies'-developing pathway, which might be independent of the shared epitope or *PTPN22 1858T* pathways.

3. Involvement of genetic interactions in RA patients:

- 3.1. We identify and replicate for the first time a genetic interaction between rs6684865 and rs4809330, located in the regions containing the *TNFRSF14* and *TNFRSF6B* loci, in the Spanish RA patients. This epistasis highlights the importance of the patient's genetic background on the effect of certain susceptibility factors.
- 3.2. Our studies do not replicate in the Spanish RA patients the epistasis between *IL1-SELS* or *RTN4-GLIS3*, previously described in Caucasian populations. These findings suggest that these interactions might have arisen as a consequence of spurious results.
- 3.3. Our hypothesis-free study of 43 markers involved in inflammatory processes which are located in 17 different chromosomal regions, do not provide reproducible results in Spanish RA patients.

1. **Correspondientes a la determinación de la asociación de genes candidatos con distintas subclases de AR y/o a la enfermedad global:**
 - 1.1. El análisis de los marcadores localizados en los *loci* *CAPSL/IL7R* en 5p13.2, *CD40* en 20q13 y *PTGER4* en la región 5p13.1, no muestra evidencias de fuerte asociación con ningún subgrupo de pacientes de AR estratificados por sexo, presencia/ausencia de anticuerpos anti-CCP, FR o EC en población española.
 - 1.2. Nuestro estudio muestra nuevas evidencias de la implicación de la región *CIITA/CLEC16A/SOCS1* en 16p13 a la susceptibilidad a desarrollar AR en población española.
2. **Relativas a la replicación en nuestra población de la asociación de marcadores previamente descritos en GWAS de AR:**
 - 2.1. El análisis conjunto de nuestros datos y de los publicados del SNP rs3761847 en la región *TRAF1/C5* muestra evidencias de asociación de este polimorfismo con AR en población europea, ejerciendo un efecto de susceptibilidad menor al que se atribuye en población americana.
 - 2.2. Confirmamos que el SNP rs6920220 localizado en la región 6q23 es un buen marcador de susceptibilidad en AR con serología positiva (FR o anti-CCP) en población española. El análisis conjunto de nuestros datos y los publicados del polimorfismo rs10499194 localizado en esta misma región, muestra evidencias de asociación a AR en población europea, ejerciendo un efecto de protección menor al que se atribuye en población norteamericana. Adicionalmente, sugerimos que el polimorfismo rs6920220 u otro en LD con él puede estar implicado en una vía de desarrollo de anticuerpos anti-CCP como lo están el EC y *PTPN22 1858T*.
3. **Pertinentes a la existencia de interacciones genéticas que permitan caracterizar grupos genéticamente homogéneos de pacientes de AR:**
 - 3.1. Identificamos y replicamos por vez primera una interacción genética entre los polimorfismos rs6684865 y rs4809330, localizados en las regiones que contienen los *loci* *TNFRSF14* y *TNFRSF6B* en pacientes españoles de AR, demostrando la importancia del trasfondo genético en el efecto de susceptibilidad de ciertos polimorfismos.
 - 3.2. Nuestros estudios no replican en pacientes españoles de AR el efecto de susceptibilidad generado por las epistasis *IL1-SELS* o *RTN4-GLIS3* descritas en otros grupos caucásicos de enfermos de AR, lo que sugiere que dichas interacciones pudieran ser resultados espurios.

- 3.3. Nuestro estudio de interacciones genéticas entre 43 marcadores asociados a procesos inflamatorios y pertenecientes a 17 regiones cromosómicas distintas, no genera resultados reproducibles en enfermos españoles de AR.

8 REFERENCIAS



- 1 Firestein, G.S. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423 (6937), 356-361
- 2 Arnett, F.C. *et al.* (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31 (3), 315-324
- 3 Alamanos, Y. *et al.* (2006) Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 36 (3), 182-188
- 4 Doran, M.F. *et al.* (2002) Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis Rheum* 46 (3), 625-631
- 5 Gabriel, S.E., Crowson C.S, Maradit Kremers H, Thorneau T.M. (2008) The rising incidence of rheumatoid arthritis [abstract]. *Arthritis Rheumatism* 58:S453
- 6 Silman, A.J. and Pearson, J.E. (2002) Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3, S265-272
- 7 Harvey, J. *et al.* (1981) Rheumatoid arthritis in a Chippewa Band. I. Pilot screening study of disease prevalence. *Arthritis Rheum* 24 (5), 717-721
- 8 Zeng, Q.Y. *et al.* (2008) Rheumatic diseases in China. *Arthritis Res Ther* 10 (1), R17
- 9 Shichikawa, K. *et al.* (1999) Changes in the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Kamitonda, Wakayama, Japan, 1965-1996. *Ann Rheum Dis* 58 (12), 751-756
- 10 Brighton, S.W. *et al.* (1988) The prevalence of rheumatoid arthritis in a rural African population. *J Rheumatol* 15 (3), 405-408
- 11 Silman, A.J. *et al.* (1993) Absence of rheumatoid arthritis in a rural Nigerian population. *J Rheumatol* 20 (4), 618-622
- 12 Hameed, K. and Gibson, T. (1997) A comparison of the prevalence of rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases amongst Pakistanis living in England and Pakistan. *Br J Rheumatol* 36 (7), 781-785
- 13 Sebbag, M. *et al.* (1995) The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 95 (6), 2672-2679
- 14 Schellekens, G.A. *et al.* (1998) Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101 (1), 273-281
- 15 Rantapaa-Dahlqvist, S. *et al.* (2003) Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48 (10), 2741-2749

- 16 Nielen, M.M. *et al.* (2004) Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 50 (2), 380-386
- 17 van Gaalen, F.A. *et al.* (2004) Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50 (7), 2113-2121
- 18 van der Helm-van Mil, A.H. and Huizinga, T.W. (2008) Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis Res Ther* 10 (2), 205
- 19 Pedersen, M. *et al.* (2007) Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: a nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis Rheum* 56 (5), 1446-1453
- 20 Huizinga, T.W. *et al.* (2005) Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 52 (11), 3433-3438
- 21 Criswell, L.A. *et al.* (2007) Dissecting the heterogeneity of rheumatoid arthritis through linkage analysis of quantitative traits. *Arthritis Rheum* 56 (1), 58-68
- 22 Combe, B. *et al.* (2007) EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 66 (1), 34-45
- 23 van der Heijde, D.M. *et al.* (1993) Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol* 20 (3), 579-581
- 24 McInnes, I.B. and Schett, G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7 (6), 429-442
- 25 Klareskog, L. *et al.* (2009) Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373 (9664), 659-672
- 26 Miltenburg, A.M. *et al.* (1992) T cells cloned from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the Th1 subset. *Scand J Immunol* 35 (5), 603-610
- 27 Chabaud, M. *et al.* (1999) Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42 (5), 963-970
- 28 Cao, D. *et al.* (2003) Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 33 (1), 215-223
- 29 Firestein, G.S. and Zvaifler, N.J. (1987) Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gamma-interferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum* 30 (8), 864-871

-
- 30 Manoury-Schwartz, B. *et al.* (1997) High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* 158 (11), 5501-5506
- 31 Vermeire, K. *et al.* (1997) Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 158 (11), 5507-5513
- 32 Murphy, C.A. *et al.* (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198 (12), 1951-1957
- 33 Alonzi, T. *et al.* (1998) Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 187 (4), 461-468
- 34 Lubberts, E. *et al.* (2005) The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 7 (1), 29-37
- 35 Youinou, P. *et al.* (2007) B-cell: a logical target for treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 25 (2), 318-328
- 36 Williams, R.O. *et al.* (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (20), 9784-9788
- 37 Ehrenstein, M.R. *et al.* (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200 (3), 277-285
- 38 Raychaudhuri, S. *et al.* (2008) Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 40 (10), 1216-1223
- 39 Barton, A. *et al.* (2008) Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat Genet* 40 (10), 1156-1159
- 40 Edwards, S.W. and Hallett, M.B. (1997) Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 18 (7), 320-324
- 41 Dalbeth, N. and Callan, M.F. (2002) A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum* 46 (7), 1763-1772
- 42 Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327 (5965), 580-583
- 43 Barland, P. *et al.* (1962) Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol* 14, 207-220
- 44 Strand, V. *et al.* (2007) Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov* 6 (1), 75-92
- 45 Lee, D.M. and Weinblatt, M.E. (2001) Rheumatoid arthritis. *Lancet* 358 (9285), 903-911
- 46 Teitelbaum, S.L. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289 (5484), 1504-1508

- 47 Meyer, L.H. *et al.* (2006) The role of mesenchymal cells in the pathophysiology of inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20 (5), 969-981
- 48 Vessey, M.P. *et al.* (1987) Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception* 35 (5), 457-464
- 49 Silman, A.J. *et al.* (1996) Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum* 39 (5), 732-735
- 50 Karlson, E.W. *et al.* (1999) A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Rheum* 42 (5), 910-917
- 51 Stolt, P. *et al.* (2003) Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis* 62 (9), 835-841
- 52 Klareskog, L. *et al.* (2006) A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 54 (1), 38-46
- 53 Padyukov, L. *et al.* (2004) A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50 (10), 3085-3092
- 54 Kobayashi, S. *et al.* (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. *Febs J* 275 (18), 4456-4462
- 55 MacGregor, A.J. *et al.* (2000) Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 43 (1), 30-37
- 56 Stastny, P. (1976) Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 57 (5), 1148-1157
- 57 Deighton, C.M. *et al.* (1989) The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* 36 (3), 178-182
- 58 Gregersen, P.K. *et al.* (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30 (11), 1205-1213
- 59 van der Helm-van Mil, A.H. *et al.* (2006) The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54 (4), 1117-1121
- 60 Imboden, J.B. (2009) The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* 4, 417-434
- 61 Dubois, P.C. and van Heel, D.A. (2008) Translational mini-review series on the immunogenetics of gut disease: immunogenetics of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 153 (2), 162-173

-
- 62 Begovich, A.B. *et al.* (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 75 (2), 330-337
- 63 Amos, C.I. *et al.* (2006) High-density SNP analysis of 642 Caucasian families with rheumatoid arthritis identifies two new linkage regions on 11p12 and 2q33. *Genes Immun* 7 (4), 277-286
- 64 Suzuki, A. *et al.* (2003) Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34 (4), 395-402
- 65 Seidl, C. *et al.* (1998) CTLA4 codon 17 dimorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 51 (1), 62-66
- 66 Todd, J.A. *et al.* (2007) Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 39 (7), 857-864
- 67 Hafler, D.A. *et al.* (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 357 (9), 851-862
- 68 Parker, A. *et al.* (2007) Peripheral blood expression of nuclear factor-kappaB-regulated genes is associated with rheumatoid arthritis disease activity and responds differentially to anti-tumor necrosis factor-alpha versus methotrexate. *J Rheumatol* 34 (9), 1817-1822
- 69 Pineda, B. *et al.* (2008) A C > T polymorphism located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19 (8), 1147-1152
- 70 Libioulle, C. *et al.* (2007) Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet* 3 (4), e58
- 71 Honda, T. *et al.* (2006) Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 203 (2), 325-335
- 72 Sheibanie, A.F. *et al.* (2007) Prostaglandin E2 exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. *Arthritis Rheum* 56 (8), 2608-2619
- 73 Goodwin, J.S. (1984) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Am J Med* 77 (1A), 57-64
- 74 Martel-Pelletier, J. *et al.* (2003) Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis* 62 (6), 501-509
- 75 Swanberg, M. *et al.* (2005) MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* 37 (5), 486-494

- 76 Martinez, A. *et al.* (2007) Role of the MHC2TA gene in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 66 (3), 325-329
- 77 Hakonarson, H. *et al.* (2007) A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 448 (7153), 591-594
- 78 Gregersen, P.K. *et al.* (2009) REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 41 (7), 820-823
- 79 Chang, M. *et al.* (2008) A large-scale rheumatoid arthritis genetic study identifies association at chromosome 9q33.2. *PLoS Genet* 4 (6), e1000107
- 80 Kurreeman, F.A. *et al.* (2007) A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* 4 (9), e278
- 81 Plenge, R.M. *et al.* (2007) Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 39 (12), 1477-1482
- 82 Thomson, W. *et al.* (2007) Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* 39 (12), 1431-1433
- 83 Raychaudhuri, S. *et al.* (2009) Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet* 41 (12), 1313-1318
- 84 De Jager, P.L. *et al.* (2009) The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (13), 5264-5269
- 85 Wu, H. *et al.* (2005) Association analysis of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 in systemic lupus erythematosus families: increased T allele frequency in systemic lupus erythematosus patients with autoimmune thyroid disease. *Arthritis Rheum* 52 (8), 2396-2402
- 86 Velaga, M.R. *et al.* (2004) The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (11), 5862-5865
- 87 Hinks, A. *et al.* (2005) Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. *Arthritis Rheum* 52 (6), 1694-1699
- 88 Canton, I. *et al.* (2005) A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. *Genes Immun* 6 (7), 584-587
- 89 Jagiello, P. *et al.* (2005) The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 52 (12), 4039-4043

-
- 90 Vandiedonck, C. *et al.* (2006) Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol* 59 (2), 404-407
- 91 Bottini, N. *et al.* (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 36 (4), 337-338
- 92 Consortium, W.T.C.C. (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447 (7145), 661-678
- 93 Coenen, M.J. *et al.* (2009) Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Hum Mol Genet* 18 (21), 4195-4203
- 94 Asano, K. *et al.* (2009) A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nat Genet* 41 (12), 1325-1329
- 95 Harley, J.B. *et al.* (2008) Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 40 (2), 204-210
- 96 Hennig, B.J. *et al.* (2008) PTPRC (CD45) variation and disease association studied using single nucleotide polymorphism tagging. *Tissue Antigens* 71 (5), 458-463
- 97 Eyre, S. *et al.* (2009) Confirmation of association of the REL locus with rheumatoid arthritis susceptibility in the UK population. *Ann Rheum Dis*
- 98 Trynka, G. *et al.* (2009) Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut* 58 (8), 1078-1083
- 99 Barton, A. *et al.* (2009) Identification of AF4/FMR2 family, member 3 (AFF3) as a novel rheumatoid arthritis susceptibility locus and confirmation of two further pan-autoimmune susceptibility genes. *Hum Mol Genet* 18 (13), 2518-2522
- 100 Hinks, A. *et al.* Association of the AFF3 gene and IL2/IL21 gene region with juvenile idiopathic arthritis. *Genes Immun*
- 101 Plenge, R.M. *et al.* (2005) Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* 77 (6), 1044-1060
- 102 Ueda, H. *et al.* (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423 (6939), 506-511
- 103 Kotsa, K. *et al.* (1997) A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46 (5), 551-554

- 104** Haimila, K. *et al.* (2009) The shared CTLA4-ICOS risk locus in celiac disease, IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Genes Immun* 10 (2), 151-161
- 105** Moser, K.L. *et al.* (1998) Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (25), 14869-14874
- 106** Gray-McGuire, C. *et al.* (2000) Genome scan of human systemic lupus erythematosus by regression modeling: evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2. *Am J Hum Genet* 67 (6), 1460-1469
- 107** Cantor, R.M. *et al.* (2004) Systemic lupus erythematosus genome scan: support for linkage at 1q23, 2q33, 16q12-13, and 17q21-23 and novel evidence at 3p24, 10q23-24, 13q32, and 18q22-23. *Arthritis Rheum* 50 (10), 3203-3210
- 108** Remmers, E.F. *et al.* (2007) STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 357 (10), 977-986
- 109** Zervou, M.I. *et al.* (2008) STAT4: a risk factor for type 1 diabetes? *Hum Immunol* 69 (10), 647-650
- 110** Prahalad, S. *et al.* (2009) Variants in TNFAIP3, STAT4, and C12orf30 loci associated with multiple autoimmune diseases are also associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 60 (7), 2124-2130
- 111** Zhernakova, A. *et al.* (2007) Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *Am J Hum Genet* 81 (6), 1284-1288
- 112** van Heel, D.A. *et al.* (2007) A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* 39 (7), 827-829
- 113** Liu, Y. *et al.* (2008) A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet* 4 (3), e1000041
- 114** Marquez, A. *et al.* (2009) Novel association of the interleukin 2-interleukin 21 region with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 104 (8), 1968-1975
- 115** Albers, H.M. *et al.* (2009) Association of the autoimmunity locus 4q27 with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 60 (3), 901-904
- 116** Graham, R.R. *et al.* (2008) Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 40 (9), 1059-1061
- 117** Li, Y. and Begovich, A.B. (2009) Unraveling the genetics of complex diseases: Susceptibility genes for rheumatoid arthritis and psoriasis. *Semin Immunol*

-
- 118 Fung, E.Y. *et al.* (2009) Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes Immun* 10 (2), 188-191
- 119 Smyth, D.J. *et al.* (2008) Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med* 359 (26), 2767-2777
- 120 Hunt, K.A. *et al.* (2008) Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet* 40 (4), 395-402
- 121 Plenge, R.M. *et al.* (2007) TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med* 357 (12), 1199-1209
- 122 Behrens, E.M. *et al.* (2008) Association of the TRAF1-C5 locus on chromosome 9 with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 58 (7), 2206-2207
- 123 Kurreeman, F.A. *et al.* (2009) The TRAF1-C5 region on chromosome 9q33 is associated with multiple autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*
- 124 Cooper, J.D. *et al.* (2008) Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* 40 (12), 1399-1401
- 125 Cooper, J.D. *et al.* (2009) Analysis of 55 autoimmune disease and type II diabetes loci: further confirmation of chromosomes 4q27, 12q13.2 and 12q24.13 as type I diabetes loci, and support for a new locus, 12q13.3-q14.1. *Genes Immun* 10 Suppl 1, S95-120
- 126 (2009) Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* 41 (7), 824-828
- 127 Kurylowicz, A. *et al.* (2005) Association of CD40 gene polymorphism (C-1T) with susceptibility and phenotype of Graves' disease. *Thyroid* 15 (10), 1119-1124
- 128 Moore, J.H. (2004) Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* 4 (6), 795-803
- 129 Huang, C.H. *et al.* (2009) Rheumatoid arthritis-associated gene-gene interaction network for rheumatoid arthritis candidate genes. *BMC Proc* 3 Suppl 7, S75
- 130 Zhao, J. *et al.* (2006) Test for interaction between two unlinked loci. *Am J Hum Genet* 79 (5), 831-845
- 131 Marinou, I. *et al.* (2009) Evidence of epistasis between interleukin 1 and selenoprotein-S with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68 (9), 1494-1497
- 132 Julia, A. *et al.* (2008) Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in the Spanish population: KLF12 as a risk locus for rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 58 (8), 2275-2286

- 133 Kugathasan, S. *et al.* (2008) Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 40 (10), 1211-1215
- 134 Yang, C.R. *et al.* (2004) Decoy receptor 3 (DcR3) induces osteoclast formation from monocyte/macrophage lineage precursor cells. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1, S97-107
- 135 Wan, X. *et al.* (2003) DcR3/TR6 modulates immune cell interactions. *J Cell Biochem* 89 (3), 603-612
- 136 Wan, X. *et al.* (2002) A TNF family member LIGHT transduces costimulatory signals into human T cells. *J Immunol* 169 (12), 6813-6821
- 137 Ishida, S. *et al.* (2008) LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor. *J Rheumatol* 35 (6), 960-968
- 138 Sakaguchi, S. *et al.* (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133 (5), 775-787
- 139 Sanchez, E. *et al.* (2005) Analysis of a GT microsatellite in the promoter of the foxp3/scurfin gene in autoimmune diseases. *Hum Immunol* 66 (8), 869-873
- 140 Takahashi, T. *et al.* (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10 (12), 1969-1980
- 141 Flores-Borja, F. *et al.* (2008) Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (49), 19396-19401
- 142 Miller, S.A. *et al.* (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 (3), 1215
- 143 Carlson, C.S. *et al.* (2004) Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 74 (1), 106-120
- 144 Duerr, R.H. *et al.* (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314 (5804), 1461-1463
- 145 Suzuki, A. *et al.* (2007) Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1108, 323-339
- 146 Smyth, D.J. *et al.* (2006) A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet* 38 (6), 617-619
- 147 Rioux, J.D. *et al.* (2001) Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 29 (2), 223-228
- 148 Nilsson, M. *et al.* (2007) Impact of estrogen receptor gene polymorphisms and mRNA levels on obesity and lipolysis--a cohort study. *BMC Med Genet* 8, 73
- 149 Firestein, G.S. (2001) VIP: a very important protein in arthritis. *Nat Med* 7 (5), 537-538

-
- 150 Tripi, L.M. *et al.* (2006) Relationship of serum paraoxonase 1 activity and paraoxonase 1 genotype to risk of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54 (6), 1928-1939
- 151 Baran, W. *et al.* (2008) IFN-gamma promoter gene polymorphism in psoriasis vulgaris. *Biomarkers* 13 (1), 52-58
- 152 Curran, J.E. *et al.* (2005) Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet* 37 (11), 1234-1241
- 153 Burgner, D. *et al.* (2003) Haplotypic relationship between SNP and microsatellite markers at the NOS2A locus in two populations. *Genes Immun* 4 (7), 506-514
- 154 Miyamoto, Y. *et al.* (2007) A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 39 (4), 529-533
- 155 Baugh, J.A. *et al.* (2002) A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 3 (3), 170-176
- 156 Lakowicz, J.R. (1983) *Energy Transfer, Principles of Fluorescence Spectroscopy*
- 157 NIMR. (www.nimr.mrc.ac.uk)
- 158 WTCCC. (2007) Data from WTCCC phase I. <http://www.ebi.ac.uk/ega>
- 159 Gregory, S.G. *et al.* (2007) Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* 39 (9), 1083-1091
- 160 Qiagen. (www.qiagen.com)
- 161 Jacobson, E.M. *et al.* (2007) A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes Immun* 8 (3), 205-214
- 162 Chizzolini, C. and Brembilla, N.C. (2009) Prostaglandin E2: igniting the fire. *Immunol Cell Biol* 87 (7), 510-511
- 163 Yoshimura, A. *et al.* (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7 (6), 454-465
- 164 Liston, A. *et al.* (2008) Unravelling the association of partial T-cell immunodeficiency and immune dysregulation. *Nat Rev Immunol* 8 (7), 545-558
- 165 Eyre, S. *et al.* (2009) No evidence for association of the KLF12 gene with RA in a large UK cohort of >7,000 samples. *Ann Rheum Dis*
- 166 Alonso-Ruiz, A. *et al.* (2008) Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety. *BMC Musculoskelet Disord* 9, 52

- 167 Tsitsikov, E.N. *et al.* (2001) TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice. *Immunity* 15 (4), 647-657
- 168 Zipfel, P.F. and Skerka, C. (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 9 (10), 729-740
- 169 Barton, A. *et al.* (2008) Re-evaluation of putative rheumatoid arthritis susceptibility genes in the post-genome wide association study era and hypothesis of a key pathway underlying susceptibility. *Hum Mol Genet* 17 (15), 2274-2279
- 170 Muller, T. *et al.* (2005) The bHLH factor Olig3 coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord. *Genes Dev* 19 (6), 733-743
- 171 Lee, E.G. *et al.* (2000) Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289 (5488), 2350-2354
- 172 Johansson, M. *et al.* (2006) PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. *Arthritis Res Ther* 8 (1), R19
- 173 Dieguez-Gonzalez, R. *et al.* (2009) Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor-kappaB and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Res Ther* 11 (2), R42
- 174 Murphy, K.M. *et al.* (2006) Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol* 6 (9), 671-681
- 175 Ware, C.F. Targeting the LIGHT-HVEM Pathway. In *Therapeutic target of the TNF superfamily* (Iqbal S. Grewal edn)
- 176 Edwards, J.R. *et al.* (2006) LIGHT (TNFSF14), a novel mediator of bone resorption, is elevated in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54 (5), 1451-1462
- 177 Bennett, C.L. *et al.* (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27 (1), 20-21
- 178 Gonzalez-Rey, E. *et al.* (2007) Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 7 (1), 52-63
- 179 Bassuny, W.M. *et al.* (2003) A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 55 (3), 149-156
- 180 Mertens, M. and Singh, J.A. (2009) Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 36 (6), 1118-1125

-
- 181** Cox, A. *et al.* (1999) Combined sib-TDT and TDT provide evidence for linkage of the interleukin-1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 8 (9), 1707-1713
- 182** Buchs, N. *et al.* (2001) IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun* 2 (4), 222-228
- 183** Cantagrel, A. *et al.* (1999) Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42 (6), 1093-1100
- 184** Cvetkovic, J.T. *et al.* (2002) Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. *J Rheumatol* 29 (2), 212-219
- 185** Ohmura, K. *et al.* (2005) Variation in IL-1beta gene expression is a major determinant of genetic differences in arthritis aggressivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (35), 12489-12494
- 186** Johnsen, A.K. *et al.* (2008) A broad analysis of IL1 polymorphism and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58 (7), 1947-1957
- 187** Barrett, J.C. *et al.* (2009) Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*
- 188** De Benedetti, F. *et al.* (2003) Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 48 (5), 1398-1407
- 189** Martinez, A. *et al.* (2007) Macrophage migration inhibitory factor gene: influence on rheumatoid arthritis susceptibility. *Hum Immunol* 68 (9), 744-747
- 190** Sanchez, R. *et al.* (2002) Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* 24 (3), 244-254
- 191** Ongphiphadhanakul, B. *et al.* (2005) A specific haplotype in the 3' end of estrogen-receptor alpha gene is associated with low bone mineral density in premenopausal women and increased risk of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 16 (10), 1233-1238
- 192** Becker, J. and Winthrop, K.L. Update on rheumatic manifestations of infectious diseases. *Curr Opin Rheumatol* 22 (1), 72-77

9 PUBLICACIONES



1. N. Perdigones, E. Martín, G. Robledo, J.R. Lamas, C. Taxonera, M. Díaz-Rubio, E.G. de la Concha, M.A. López-Nevot, A. García, M. Gómez-García, B. Fernández-Gutiérrez, J. Martín, E. Urcelay. "Study of chromosomal region 5p13.1 in Crohn's disease, ulcerative colitis, and rheumatoid arthritis". Human Immunol. 2010, Aug; 71 (8):826-8.
2. N. Perdigones, A. G Vigo, J.R Lamas, A. Martínez, A. Balsa, D. Pascual-Salcedo, E.G de la Concha, B. Fernández-Gutierrez, E. Urcelay. "Evidence of epistasis between TNFRSF14 and TNFRSF6B polymorphisms in Rheumatoid Arthritis patients". Arthritis Rheum. 2010, Mar; 62(3):705-710.
3. N. Perdigones, J.R. Lamas, A.G. Vigo, E.G. de la Concha, J.A. Jover, E. Urcelay, B.F. Gutiérrez, A. Martínez. "6q23 polymorphisms in rheumatoid arthritis Spanish patients". Rheumatology (Oxford). 2009, Jun; 48(6): 618-21.
4. Martínez, N. Perdigones, M.C. Cenit, L. Espino, J. Varadé, J.R. Lamas, J.L. Santiago, M. Fernández-Arquero, H. de la Calle, R. Arroyo, E.G. de la Concha, B. Fernández-Gutiérrez, E. Urcelay. "Chromosomal region 16p13: further evidence of increased predisposition to immune diseases". Ann Rheum Dis. 2010, Jan; 69 (1): 309-11.



Hospital Clínico San Carlos

